

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO ÓLEO  
DESTILADO DE COPAIBA (*Copaifera* spp. - Leguminosae-  
Caesalpinoideae) E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.

**EVANDRO DE ARAÚJO SILVA**

**MANAUS  
2019**

**EVANDRO DE ARAÚJO SILVA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO ÓLEO  
DESTILADO DE COPAIBA (*Copaifera* spp. - Leguminosae-  
Caesalpinoideae) E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Inovação Farmacêutica como  
requisito para a obtenção do Título de Doutor  
em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coorientador: Prof. Dr. Jesus Rafael Rodriguez Amado

**MANAUS  
2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Evandro de Araújo  
Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (Copaifera spp. - LeguminosaeCaesalpinoideae) e aplicações biotecnológicas / Evandro de Araújo Silva. 2019  
137 f.: il. color; 31 cm.

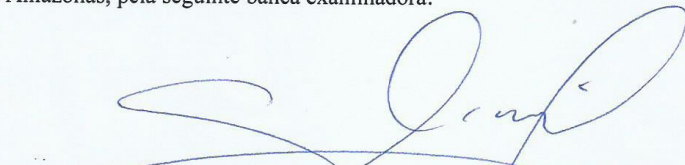
Orientador: Emerson Silva Lima  
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Copaíba. 2. -cariofileno. 3. Nanoemulsão. 4. Atividade anti-nociceptiva. 5. Antiedematogênica. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

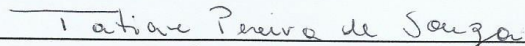
Evandro de Araújo Silva

AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO ÓLEO  
DESTILADO DE COPAIBA (*Copaifera spp.*) E APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS

Tese aprovada como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica, no Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Emerson Silva Lima (Orientador)  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



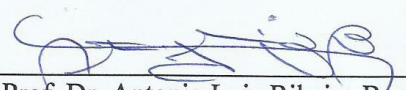
Prof.ª. Dr.ª. Tatiane Pereira de Souza  
Universidade Federal do do Amazonas - UFAM



Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA



Prof.ª. Dr.ª. Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof. Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

## AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço em especial a minha família, minha esposa Renata Baraúna Silva (*in memorian*), minhas filhas Carolina e Danielle, e aos meus netos Miguel, Mark Filho e Murilo que sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, onde iniciei minha vida acadêmica e pude ingressar no curso de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, foi graças a essa oportunidade que hoje eu cheguei até aqui.

Meus sinceros agradecimentos aos professores Dr. Emerson Silva Lima (orientador), Dr. Jesus Rafael Rodriguez Amado (coorientador) pela dedicação ao ensino, à pesquisa e pela orientação segura e paciente que possibilitou a realização desse trabalho.

Meus agradecimentos aos professores e pesquisadores Dr. Hector Koolen, Dr. Almir Wanderley, Dr. Irwin Alencar e a Dra. Geane Antiques Lourenço pela parceria firmada, pelo acolhimento, pela disponibilidade e por me fornecer todas as ferramentas possíveis para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos os companheiros de caminhada do Laboratório Biophar, cada um teve sua parcela de contribuição direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Aos colegas de laboratório Leonard Acho e a Márcia de Jesus que me ajudaram incansavelmente na realização dos experimentos.

E finalmente agradeço as colegas de trabalho Giane Oliveira, Diego Squinello e a professora Dra. Patrícia Daniele pelo apoio e solidariedade que me prestaram ao longo dessa caminhada.

Sou muito grato a todos vocês!

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A $\beta$ : Fibras dos neurônios nociceptivos mielinizadas A Beta

A $\delta$ : Fibras dos neurônios nociceptivos mielinizadas A Delta

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: Trifosfato de adenosina

$\beta$ -Car: Beta-cariofileno

C: Fibras dos neurônios nociceptivos amielínicas C

CB2: receptor canabinóide 2

CCK: colecistocinina

CGRP: peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

CIATEJ: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

COX-1: Ciclo-oxigenase-1

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

De: Derme

DL<sub>50</sub>: Dose Letal 50%

DMSO: dimetilsulfóxido

DPM: desvio padrão da média

EGF: fatores de crescimento epidérmico

EHL: Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

Ep: epiderme

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GRD: Gânglio da raiz dorsal da medula espinhal

CG-EM: Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa

H2: receptores de histamina-2

HDC: enzima histidina-descarboxilase

IASP: *International Association for the Study of Pain*

IBP: Inibidores da bomba de prótons

iNOS: sintase induzível responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) e ciclo-oxigenases (COXs).

K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> ATPase: Adenosina TriFosfatase ou bomba de prótons

LPS: lipopolisacarídeo

Me: corpúsculos sensitivos de Meissner

MRC5: Linhagem de célula de fibroblasto humano

MTT: ensaio colorimétrico

NE: Neurônio espinal

NF-κB: fator nuclear kappa B

NSRIs: antidepressivos inibidores não seletivos da recaptação de serotonina

OBC: Óleo bruto de copaíba (Óleo Resina)

OCM: Óleo de *Copaifera multijuga*

ODC: Óleo destilado de copaíba (fração volátil do óleo resina de copaíba)

Pa: corpúsculos sensitivos de Vater-Pacini

PDGF: fatores de crescimento derivados de plaquetas

PGs: prostaglandinas

RD: Raiz dorsal da medula espinal

ROS: espécies reativas de oxigênio

Rpm: rotações por minuto

RV: Raiz dorsal da medula espinal

SP: Substância P

SSRIs: antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina

TGF-β: fator transformador de crescimento beta

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNL: terminações nervosas livres

UD: Úlcera duodenal

UG: Úlcera gástrica

UP: Úlcera péptica

VIP: peptídeo vasoativo intestinal

VPL: Núcleo posterior-medial-lateral do tálamo

VPM: Núcleo ventro-póster-medial do tálamo



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representando a medula espinhal, com as suas raízes ventral (RV) e dorsal (RD). .....	19
Figura 2 - Delineamento experimental do presente estudo. ....	55
Figura 3 - Equipamento piloto de extração de óleos essenciais tipo CIATEJ.....	57
Figura 4 - Óleo-resina de copaíba (OBC).....	57
Figura 5 - Óleo destilado de copaíba (ODC).....	71
Figura 6 - Curva de calibração para a quantificação do beta-cariofileno do ODC.. .....	73
Figura 7 - Cromatograma da presença do beta-cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC) quando comparado ao cromatograma do padrão de beta-cariofileno.....	74
Figura 8 - Picos dos principais compostos no óleo destilado de copaíba (ODC) da <i>Copaifera spp</i> .....	74
Figura 9 - (A) Nanoemulsão branco e (B) nanoemulsão contendo 15% do óleo Destilado de copaiba (ODC).....	76
Figura 10 - Valores dos EHL da nanoemulsão relacionados ao tamanho de partículas..	77
Figura 11 - Diagrama de fases do processo de avaliação do efeito das proporções de tensoativo-óleo-água nas propriedades da nanoemulsão de óleo destilado de copaíba..	78
Figura 12 - Estabilidade da nanoemulsão contendo 15% de ODC nos primeiros 45 dias de preparada.....	79
Figura 13 – (A) Efeito do óleo bruto de copaiba (OBC) e (B) óleo destilado de copaíba (ODC) sobre a viabilidade de fibroblastos humanos MRC5 avaliado pelo método do MTT.....	79
Figura 14 - (A) Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5) na presença da NE15% e em (B) macrófagos J744 de camundongos na presença da nanoemulsão contendo 15% de ODC.....	80
Figura 15 - Ensaio concentração-resposta do óleo destilado de copaíba (ODC) e da nanoemulsão contendo 15% de ODC na produção de nitrito.....	81
Figura 16 - Efeito do pré-tratamento na administração oral do óleo bruto de copaiba (OBC) (100 mg/Kg) e do óleo destilado de copaiba (ODC) (100 mg/Kg) no teste de contorções abdominais induzido pelo ácido acético.....	83
Figura 17 - Efeito do pré-tratamento na administração oral do óleo bruto de copaiba (OBC) (100 mg/Kg) e do ODC (100 mg/Kg) no teste de lambadura de pata injetada com formalina.....	83

Figura 18 - Efeito do pré-tratamento da administração oral do OBC (100 mg/Kg) e do óleo destilado de copaiba (ODC) (100 mg/Kg) no teste o edema de pata induzido pela carragenina.....	84
Figura 19 - Efeito do pré-tratamento da administração oral do óleo bruto de copaiba (OBC) e do óleo destilado de copaiba (ODC) em úlceras induzidas por etanol em ratos.....	87
Figura 20 - Efeito das preparações contendo óleo bruto de copaiba (OBC), óleo destilado de copaíba (ODC) e nanoemulsão do óleo destilado de copaíba (NE 15%) sobre a peritonite induzida pelo LPS em camundongos.....	88
Figura 21 - Efeito da nanoemulsão do óleo destilado de copaíba (NE 15%) sobre o edema de orelha induzido por fenol a 10%.....	89
Figura 22 – Efeitos após o pré-tratamento com preparações OBC; ODC: NE, NE 15% e DS sobre a indução da artrite pelo zymosan em edema de pata em camundongos.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da DL <sub>50</sub> do óleo-resina da copaíba obtido de diferentes espécies de copaiba .....	33
Tabela 2 - Composição das nanoemulsões utilizadas para a determinação do EHLr do ODC.....	60
Tabela 3 - Caracterização físico-química do óleo destilado de copaiba (ODC).....	75
Tabela 4 - Composição química do óleo destilado de copaíba (ODC) do óleo-resina da <i>Copaifera spp.</i> .....	75
Tabela 5 - Efeito dos sistemas de surfactantes sobre as principais propriedades da nanoemulsão contendo óleo destilado de copaiba (ODC).....	77
Tabela 6 - Efeito da relação surfactante: óleo:água (SOW) sobre as propriedades da nanoemulsão contendo o óleo destilado de copaíba (ODC).....	79

## RESUMO

O óleo-resina bruto (OBC) da *Copaifera* (*Copaifera* spp.) tem sido usado pelas populações amazônicas para o tratamento de inflamações, na cicatrização de feridas, em bronquites e úlceras da pele. O OBC obtido de distintas espécies possui diferenças na sua composição química, tornando difícil a padronização para sua utilização na indústria farmacêutica e cosmética. No entanto, a fração volátil do OBC poderia ser uma alternativa viável para a padronização pois, ainda obtida de diversas espécies, apresenta uma composição química mais homogênea. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição físico-química e química, e atividade tóxico-farmacológica do ODC e de uma nanoemulsão preparada com esse óleo. O ODC foi obtido por destilação por arraste a vapor a partir do OBC. Foram avaliadas as propriedades organolépticas, as propriedades físicas (aspecto, densidade, pH), e sua composição química por CG/EM. Em seguida, foi desenvolvida a nanoemulsão contendo 15% de ODC (NE15%). Avaliou-se a atividade anti-inflamatória, antiartrítica, a toxicidade aguda oral e a citotoxicidade do ODC e da nanoemulsão. O ODC possui na sua composição 14 sesquiterpenos, apresentando maior conteúdo o  $\beta$ -cariofileno (40,7%). A NE15% apresentou tamanho de partícula de 99,47 nm, índice de polidispersão de 0,224 e potencial zeta de -37,10 mV. A nanoemulsão mostrou estabilidade em prateleira por até 180 dias. A NE15% mostrou inibição de óxido nítrico maior do que o ODC, e uma potente atividade antinociceptiva em camundongos na dose de 100 mg/Kg, que foi similar à indometacina e à morfina. O ODC e o OBC mostraram atividade anti-ulcerogênica, em ratos, em lesões gástricas induzidas por etanol (10 mg/kg e 400mg/kg). A NE15% mostrou atividade anti-inflamatória similar a dexametasona e maior do que o ODC (teste de edema de orelha em camundongos) e produziu um efeito antiartrítico mais potente do que ODC e o OBC. Tanto a nanoemulsão quanto o ODC não apresentaram citotoxicidade no teste com fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5), nem toxicidade aguda na dose máxima de 2000 mg/kg em camundongo Balb C. Os resultados do presente estudo poderão permitir a introdução do ODC como matéria-prima para indústria e da NE15% como princípios ativos de formas farmacêuticas acabadas, que poderiam ser utilizados na terapêutica anti-inflamatória

**Palavras chave:** copaíba,  $\beta$ -cariofileno, nanoemulsão, atividade anti-nociceptiva, anti-edematogênica, antiartrítica e anti-ulcerogênica

## ABSTRACT

The crude oil-resin (OBC) of *Copaifera* (*Copaifera* spp.) has been used by Amazonian populations for the treatment of inflammation, wound healing, bronchitis and skin ulcers. OBC obtained from different species has differences in its chemical composition, making difficult to standardize its use in the pharmaceutical and cosmetic industry. However, the volatile fraction of OBC could be a viable alternative for the standardization because, even from different species, it presents a more homogeneous composition. The objective of this study was to evaluate the physicochemical, chemical composition and the toxic-pharmacological activity of the ODC and the nanoemulsion prepared with this oil. ODC was obtained by steam distillation. Its organoleptic properties, physical properties (aspect, density, and pH) and the chemical composition by GC/MS were evaluated. Subsequently, the nanoemulsion containing 15% of ODC (NE15%) was developed. The anti-inflammatory and antiarthritic activity, the acute oral toxicity and cytotoxicity of the ODC and nanoemulsion were evaluated. The ODC contains 14 sesquiterpenes in its composition, being  $\beta$ -caryophyllene (40.7%) the most abundant. NE15% presented a particle size of 99.47 nm, a polydispersity index of 0.224, and a zeta potential of -37.10 mV. The nanoemulsion showed stability on shelf conditions for up to 180 days. NE15% presented an inhibition on the production of NO higher than the ODC, and potent anti-nociceptive activity in mice at a dose of 100 mg/kg, which was similar to indomethacin and morphine. ODC and OBC showed anti-ulcerogenic activity in rats in gastric lesions induced by ethanol (doses of 10 and 400 mg/kg). NE15% showed an anti-inflammatory activity similar to dexamethasone and higher than the ODC (ear edema test, in mice) and produced a potent antiarthritic effect that was superior to the ODC and OBC. Both nanoemulsion and ODC showed neither cytotoxicity against non-neoplastic human lung fibroblasts (MRC-5), nor acute toxicity at the maximum dose of 2000 mg/kg in Balb C mice. The results of this study may allow the introduction of the ODC as raw material for industry and the use of the NE15% as an active ingredient in finished pharmaceutical forms, which could be used in the anti-inflammatory therapy.

**Key words:** copaiba,  $\beta$ -caryophyllene, nanoemulsion, anti-nociceptive activity, anti-edematogenic activity, antiarthritic activity and anti-ulcerogenic activity.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1. Dor e Nocicepção.....	17
2.2 Inflamação .....	23
2.3 Úlcera péptica .....	27
2.4 Química e farmacologia do óleo-resina de copaíba.....	32
2.5 Química e atividade farmacológica de sesquiterpenos .....	39
2.6 Química e atividade farmacológica do $\beta$ -cariofileno.....	41
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	54
3.1 Objetivo Geral .....	54
3.2 Objetivos Específicos.....	54
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	55
4.1 Delineamento experimental.....	55
4.2 Material vegetal .....	56
4.3 Obtenção do óleo destilado de copaíba (ODC) por arraste a vapor .....	56
4.4 Caracterização físico-química do óleo destilado de copaíba (ODC).....	57
4.5 Caracterização química e quantificação de $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC).....	59
4.7 Cultivo celular .....	62
4.8 Ensaio em cultura de células.....	63
4.8.1 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular .....	63
4.9 Animais .....	64
4.9.1 Teste de toxicidade aguda oral.....	65
4.9.2.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	65
4.9.2.2 Teste da formalina a 2,5% .....	66
4.9.3 Atividade anti-edematogênica do óleo destilado de copaíba (ODC).....	66
4.9.3.1 Teste do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	66
4.9.4 Teste da úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto.....	67
4.9.6 Teste do edema de orelha induzido pela aplicação única de fenol a 10%.....	69
4.10 Análise Estatística .....	70
<b>5. RESULTADOS</b> .....	71
5.1 Caracterização físico-química do óleo destilado de copaíba (ODC).....	71

5.2 Caracterização química e quantificação de $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC) - Análises por CG-EM .....	72
5.6 Toxicidade aguda oral.....	82
5.7 Atividade anti-nociceptiva .....	82
5.9 Avaliação da úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto .....	86
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>109</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a raça humana (FERREIRA, 2008) e tem curado ao homem em muitos dos seus problemas de saúde (NEWALL *et al.*, 2002). No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação terapêutica, onde as propriedades medicinais empíricas são propagadas por usuários ou comerciantes (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005). Muitas plantas têm poder curativo e o Brasil é rico em espécies vegetais que podem servir como remédio (WERNER, 1994).

As copaibeiras são árvores nativas da região tropical da América Latina (KOBAYASHI *et al.*, 2011) e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México até o norte da Argentina (DWYER, 1945; VON MARTIUS; BENTHAM, 1870; DWYER, 1951; ALENCAR, 1988). O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinoideae) possui 72 espécies (DWYER, 1951), sendo encontradas no Brasil, principalmente, nos estados do Pará e Amazonas (WILLIS, 1973). O óleo-resina de copaíba é obtido a partir de exsudados dos troncos de árvores do gênero *Copaifera* (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007; LEANDRO *et al.*, 2012). Na Região Norte o óleo-resina da copaibeira tem sido usado pelas populações amazônicas devidas suas propriedades de cura de aproximadamente trinta tipos de doenças, que vão desde inflamações e cicatrização de feridas epidérmicas (GOMES *et al.*, 2010; GUIMARÃES-SANTOS *et al.*, 2012) até o tratamento de bronquites, úlceras e câncer (LIMA *et al.*, 2003).

Óleos de várias espécies de *Copaifera* são comumente encontrados em farmácias e nos mercados sendo amplamente comercializados pelo uso medicinal popular (SOUZA BARBOSA *et al.*, 2013) e como matéria-prima na indústria de cosméticos (CASCON e GILBERT, 2000). Também, são extensivamente comercializados na forma farmacêutica de cápsulas ou líquida como anti-inflamatório e antisséptico (GOMES *et*



al., 2007; VEIGA JUNIOR et al., 2007). O óleo de copaíba pode ser encontrado nas antigas farmacopeias Europeias e dos Estados Unidos (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Trabalhos anteriores comprovaram as atividades anti-inflamatórias, anti-nociceptiva e anti-ulcerogênica do óleo-resina de copaíba (CASCON; GILBERT, 2000; GOMES et al., 2007; VEIGA JUNIOR et al., 2007), porém o óleo-resina de copaíba bruto não tem uma composição química homogênea, o que torna difícil a reprodutibilidade dos resultados envolvendo esse produto (CASCON; GILBERT, 2000; GOMES et al., 2007). No entanto, nosso grupo de trabalho tem observado que, no óleo destilado (a fração volátil) do óleo-resina de diversas espécies de copaíba, tem uma composição química relativamente constante, onde o  $\beta$ -cariofileno é a substância encontrada em maior proporção, podendo ser o produto destilado uma forma de padronizar esse óleo como matéria prima para a indústria farmacêutica. Por outro lado, não foram achados estudos envolvendo o óleo destilado de copaíba na terapêutica, e nem tampouco trabalhos envolvendo o óleo destilado de copaíba em formulações nanotecnológicas.

Diante do exposto, este trabalho teve como finalidade a caracterização físico-química e química do óleo destilado de copaíba (ODC), para sua utilização como ativo na preparação de nanoemulsões. Adicionalmente, foram avaliadas as atividades anti-inflamatórias, anti-nociceptiva e anti-ulcerogênica do ODC e anti-inflamatória da nanoemulsão contendo ODC comparadas com a atividade do ODC e do óleo bruto de copaíba tanto *in vitro* como *in vivo*.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Dor e Nocicepção**

O desenvolvimento de tratamentos para alívio da dor tem sido o fator de motivação para muitos estudos realizados por pesquisadores acadêmicos e pela indústria farmacêutica em resposta à demanda por novos analgésicos mais potentes e que não promovam efeitos colaterais potenciais, visto que, no presente momento a morfina continua sendo a melhor alternativa, apesar dos seus efeitos colaterais (OLIVEIRA et al., 2008). Devido à baixa eficácia e expressivos efeitos adversos apresentados pela maioria dos fármacos, para o alívio da dor, disponíveis no mercado farmacêutico, surge o grande interesse dos pesquisadores em investigar plantas com atividade analgésica para a descoberta de novos protótipos de fármacos provenientes de plantas da flora brasileira, em razão de que, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (SILVA et al., 2013).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo. Essa é dramaticamente ilustrada pelo exame de indivíduos que sofrem de analgesia congênita que os tornam incapazes de detectar estímulos dolorosos. Essas pessoas não são capazes de detectarem estímulos nocivos como sentir a dor penetrante de um objeto cortante, o calor de uma chama, ou mesmo o desconforto associado a lesões internas, como um osso quebrado. Como resultado, elas sofrem lesões devido à falta de reflexos protetores contra essas condições muitas das quais podem ser fatais (BASBAUM et al., 2009).

Mais comumente, as alterações da via da dor levam a hipersensibilidade de modo que mostra sua utilidade como um sistema de alerta agudo e, de outra forma, pode tornar-se um problema crônico e debilitante. Estímulos inócuos, como o leve toque ou

calor podem ser percebidos como dolorosos (um fenômeno referido como alodinia) ou estímulos normalmente dolorosos podem provocar dor com maior intensidade (referida como hiperalgesia). Indivíduos que sofrem de artrite, neuralgia pós-herpética ou câncer ósseo experimentam dor intensa e muitas vezes incessante que não é apenas fisiológica e psicologicamente debilitante, mas também pode dificultar a sua recuperação. A dor crônica pode persistir mesmo após uma lesão aguda, talvez a dor lombar ou ciática sejam as mais comumente experimentadas (BASBAUM et al., 2009).

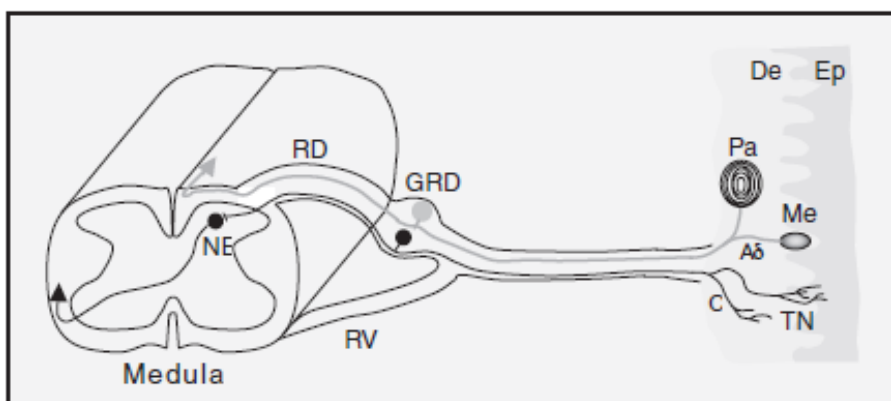
Dor e nocicepção diferem entre si, sendo que a nocicepção representa o processo de transmissão aos centros envolvidos em informação da percepção sobre um estímulo que tem potencial para causar danos nos tecidos (ORIGONI et al., 2014). A dor não só inclui as vias envolvidas na transmissão do estímulo, mas também envolve uma resposta emocional. A *International Association for the Study of Pain* (IASP) define a dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrito em termos de tais danos" (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Pela definição torna-se claro que a dor é uma sensação subjetiva e que o grau de ansiedade, atenção e distração, experiências passadas, memórias e muitos outros fatores podem aumentar ou diminuir a experiência da dor, o que a torna uma experiência emocional e não simplesmente sensorial (OSSIPOV et al., (2010; ORIGONI et al., 2014).

O termo nocicepção refere-se ao reconhecimento do estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Sendo assim, uma vez que os animais não são capazes de expressar verbalmente os componentes subjetivos da dor, pode-se dizer que neles não se avalia a dor e sim nocicepção (SILVA et al., 2013). Os termos dor e analgesia por envolver o componente emocional são empregados para estudos em humanos (WOOLF, 2004; KLAUMANN et

al., 2008), enquanto que nociceção e antinociceção são mais utilizados para estudos em modelos animais (JONES, 1992; KANDEL et al., 2003).

Nociceção é um processo neural pelo qual estímulos nocivos (térmicos, mecânicos ou químicos) são detectados e transmitidos para o cérebro usando o caminho de dor, através de neurônios do sistema nervoso periférico chamado de nociceptores. (BASBAUM; JESSELL, 2000; LOPES, 2003; WOOLF, 2004). Os nociceptores são encontrados na pele, músculo, tecidos conjuntivos, vasos sanguíneos e vísceras (BEKTAS et al., 2015). Os nociceptores como qualquer neurônio aferente primário, possuem um pericário ou corpo celular, localizado nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal (GRD), do qual parte um prolongamento que se bifurca, originando um processo central que se dirige e termina no corno dorsal da medula espinhal e um prolongamento periférico que percorre os nervos sensitivos e vai terminar nos diversos órgãos periféricos constituindo a fibra sensitiva (LOPES, 2003; BASBAUM et al., 2009) (Figura1).

**Figura 1 - Esquema representando a medula espinhal, com as suas raízes ventral (RV) e dorsal (RD).** Nesta, o gânglio da raiz dorsal GRD aloja os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão representados um neurônio sensível a estímulos inócuos (●) e outro sensível a estímulo nódico (●). Os prolongamentos periféricos dos neurônios constituem as fibras sensitivas e dirigem-se à derme (De) e epiderme (Ep). Os neurônios inócuos possuem fibras mielinizadas (A $\beta$ ) que terminam em corpúsculos sensitivos como os de Vater-Pacini (Pa) ou Meissner (Me). As fibras dos neurônios nociceptivos são amielínicas (C) (ou mielínicas finas, não representadas) e terminam sem especificações aparente nas chamadas terminações livres (TNL). Os prolongamentos centrais dos aferentes primários penetram na medula espinhal pelas raízes dorsais, e, enquanto os A $\beta$  ascendem nos cordões dorsais para ir terminar nos núcleos *gracilis* e *cuneatus* do bulbo raquidiano, os nociceptivos terminam no corno dorsal da medula espinhal, estabelecendo sinapses com neurônio espinhais (NE) cujos axônios cruzam a linha média e ascendem na substância branca contralateral para vários núcleos supra espinhais.  
FONTE: LOPES, 2003.



Nociceptores são excitados apenas quando as intensidades de estímulo atingem o alcance nocivo (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2004) sugerindo que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar e responder seletivamente estímulos potencialmente prejudiciais (BASBAUM et al., 2009). Existem duas grandes classes de nociceptores. O primeiro inclui fibras aferentes mielinizadas de diâmetro médio, velocidade de condução rápida (A $\delta$ ) que medeiam à dor aguda e localizada, é a "primeira" fase da dor. Essas fibras aferentes mielinizadas diferem consideravelmente das fibras A $\beta$  de maior diâmetro, condutoras rápidas e que respondem a estimulação mecânica inócua (isto é, ao leve toque). A segunda classe de nociceptores inclui fibras "C" de diâmetro pequeno, multimodal, não mielinizada e de velocidade de condução mais lenta, é a "segunda" fase da dor, a dor tardia e difusa. (JULIUS; BASBAUM, 2001; CRUCIANI; NIETO, 2006; BASBAUM et al., 2009).

Em uma lesão, os danos dos tecidos são muitas vezes acompanhados pela acumulação de fatores endógenos liberados de nociceptores ativados ou por células não neurais que residem dentro ou que se infiltram na área lesada (incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos) (BASBAUM et al., 2009). Coletivamente, esses fatores denominados "sopa inflamatória", representam uma grande variedade de moléculas de sinalização, incluindo neurotransmissores, peptídeos (substância P-SP, peptídeo relacionado com o gen da calcitonina-CGRP, bradicinina), eicosinóides e lipídios relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides), neurotrofinas, numerosas citocinas [interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )], quimiocinas, ATP, óxido nítrico (NO $\cdot$ ) bem como proteases extracelulares e prótons. Notavelmente, os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capazes de reconhecer e responder a cada um desses agentes pró-inflamatórios ou pró-algésicos. Tais interações aumentam a excitabilidade da fibra nervosa,

aumentando sua sensibilidade à temperatura ou ao toque (BASBAUM; JESSELL, 2000; LOPES, 2003; CRUCIANI; NIETO, 2006; McMAHON et al., 2008; BASBAUM et al., 2009; RITNER et al., 2009; BEKTAS, et al., 2015).

O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação da energia patente nos estímulos agressivos em impulsos nervosos, ou seja, em potenciais de ação e conduzi-los até à medula espinhal (LOPES, 2003; ROCHA et al., 2007). A ativação de nociceptores gera potenciais de ação que se propagam centrípetamente até o corpo do neurônio pseudo-bipolar que está localizado no gânglio da raiz dorsal (GRD), para logo ser transmitido ao corno posterior que está organizado em lâminas de neurônios distintos anatômica e eletrofisiologicamente e que recebem projeções específicas de diferentes tipos de fibras (BASBAUM; JESSELL, 2000; CRUCIANI; NIETO, 2006). Os receptores específicos para dor localizado nas terminações de fibras nervosas A $\delta$  e C, quando ativados sofrem alterações na sua membrana permitindo a deflagração de potenciais de ação (ROCHA et al., 2007). É assim que os neurônios aferentes primários localizados na lâmina I recebem informações nociceptivas diretamente usando fibras da classe C, enquanto as localizadas nas lâminas I e IV recebem informações dolorosas diretas e por fibras C ou A $\delta$  (JULIUS; BASBAUM, 2001; CRUCIANI; NIETO, 2006).

É nesse nível que os axônios GRD fazem sinapse com os neurônios de projeção (BASBAUM et al., 2009). Em condições normais a ativação de um órgão por um estímulo doloroso resulta na liberação de glutamato e substância P, os quais ativam receptores específicos localizados nas pós-sinapsis. A quantidade de neurotransmissor (glutamato e substância P) liberado a este nível é regulada positivamente pelos neuropeptídeos CGRP (peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina), CCK (colecistocinina), VIP (peptídeo vasoativo intestinal) ou negativamente por encefalinas,

que se conectam a receptores específicos localizados na pré e pós-sinapsis (CRUCIANI; NIETO, 2006).

O efeito na pós-sinapsis é mais complexo. A geração de um potencial de ação é o resultado da somatória de pequenas mudanças no potencial da membrana, que levam o potencial de membrana para um valor menos negativo (por exemplo, de -70 mV a -60), aproximando-se do umbral da geração de um potencial de ação (CRUCIANI; NIETO, 2006). As encefalinas têm ação anti-nociceptiva e estão envolvidas no processo de redução da neuroplasticidade e hiperalgesia, elas interferem com a geração desses potenciais pós-sinápticos miniaturas e assim, evitam o disparo de potenciais de ação (CRUCIANI; NIETO, 2006; ROCHA et al., 2007).

Além disso, as encefalinas alteram a permeabilidade da membrana ao potássio (tornando o seu potencial de repouso mais negativo), afastando-se do limiar e dificultando ainda mais a geração de potenciais de ação. Esses interneurônios liberadores de encefalina estão regulados por vias descendentes as quais normalmente são inibidos por neurônios contendo GABA (o neurotransmissor inibitório mais abundante no sistema nervoso central - SNC) e estão localizados na matéria cinzenta periaquedutal (CRUCIANI; NIETO, 2006) Ao produzir-se um estímulo doloroso são liberadas endorfinas na matéria cinzenta periaqueductal, as quais inibem os neurônios inibitórios (liberadores de GABA) (LOPES, 2003; CRUCIANI; NIETO, 2006; BASBAUM et al., 2009).

O resultado dessa dupla inibição é a facilitação das vias descendentes que eventualmente resultará em: I) liberação aumentada de encefalinas pelos interneurônios localizados no corno posterior; II) diminuição da quantidade de glutamato e substância P na biofase (neurotransmissores das vias ascendentes de impulsos dolorosos); III) conseqüentemente, menor transmissão de impulsos dolorosos para o tálamo e deste para o córtex sensível. Estas vias descendentes têm como mediadores os neurotransmissores

serotonina e norepinefrina. Como esses neurotransmissores são regulados por antidepressivos tricíclicos, os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) e NSRIs (não seletivo), especula-se que o mecanismo analgésico (independente do efeito antidepressivo) que apresentam estes constituintes seja pelo menos em parte por desinibição desta via descendente (CRUCIANI; NIETO, 2006).

## **2.2 Inflamação**

A inflamação é um processo fisiopatológico e um mecanismo protetor importante de resposta de defesa, geralmente benéfica ao organismo, que atua para remover os efeitos da agressão, promover a sobrevivência do tecido, reparar e recuperar o tecido lesado, conservar a energia do organismo ou para neutralizar agentes prejudiciais, embora inicialmente benéfica ela possa perder sua função reparadora de cicatrizar e reconstituir o tecido lesado (ALLER et al., 2006; LIMA et al., 2007; MEDZHITOV, 2008; BEZERRA et al., 2014; CRUZ, 2016).

Quando o estímulo desencadeante do processo inflamatório é autolimitado ou controlado por tratamento, a inflamação é inibida e as repercussões sanadas. Caso a inflamação seja extensiva, prolongada e não seja tratada adequadamente, pode persistir ou recidivar, levando a um padrão de cronicidade, como ocorre em neoplasias, colagenoses e infecções crônicas (BALLOU; KUSNHER; 1993; VOLANAKIS; 1993; BAUMANN; GAULDIE; 1994; LIMA et al., 2007). Alguns desses agentes podem ser patógenos (bactérias, fungos e vírus), agentes físicos (radiação, trauma, objetos cortantes ou queimaduras), químicos (poluentes, toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual, bem como reações imunológicas (hipersensibilidade) (ROBBINS, 1986; MONTENEGRO; FRANCO, 1999; LIMA et al., 2007; ASHLEY et al., 2012).



A inflamação pode liberar ou gerar uma população diversificada de mediadores pró-inflamatórios, como bradicininas, serotonina, histaminas, prostaglandinas e óxido nítrico. Essas substâncias frequentemente desencadeiam manifestações clínicas, tais como dor, calor, vermelhidão (rubor), tumor (edema) e o quinto sinal, perda da função do tecido ou órgão lesado e pode produzir hiperalgesia ou alodinia (ROBBINS, 1986; ARSATI; VEIGA, 1999; BEZERRA et al., 2014). O rubor e o calor são o resultado de um aumento da circulação na área inflamada. A dor localizada depende da migração e do acúmulo de leucócitos inflamatórios nos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas (MONTENEGRO; FRANCO, 1999; LIMA et al., 2007). O edema é a consequência do aumento da permeabilidade vascular na região afetada e exsudação de fluído local (ROBBINS, 1986; MONTENEGRO; FRANCO, 1999).

Dependendo de sua duração, a inflamação pode ser classificada em duas categorias: inflamação aguda e inflamação crônica. A inflamação aguda é uma reação imediata, precoce e rápida, é a resposta do sistema imunológico que ativa várias vias intracelulares e intercelulares contra os patógenos (RUH et al., 2013; CRUZ, 2016) e a lesão tecidual pode durar desde poucos minutos até alguns dias, é um processo mediado por eicosanóides e aminas vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular, levando a exsudação de proteínas fluidas e plasmáticas, com acúmulo na região inflamada de líquido (edema), fibrina (que se forma no interstício pela interação entre componentes do plasma e fatores dos tecidos), e inclui a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras, para o local infectado (LIMA et al., 2007; RUH et al., 2013). Na inflamação aguda, quando o sistema imunológico elimina com sucesso os agentes prejudiciais, a reação desaparece, mas se a resposta não

removê-los podem causar uma inflamação crônica (ROBBINS, 1986; MONTENEGRO; FRANCO, 1999; KUMAR et al., 2012; BEZERRA et al., 2014).

A inflamação crônica persiste por semanas e meses, é a inflamação que resulta de um estímulo agressivo pelo agente causal ocorrendo fenômenos produtivos no local, onde a resposta em cascata da coagulação sanguínea e vias inflamatórias são mobilizadas e inclui a proliferação de vasos, fibroblastos (com consequente deposição de colágeno), aumento da permeabilidade em microvasos, a ligação de células circulantes aos vasos na proximidade do local de lesão, como também proliferação e migração celular na recuperação tecidual como macrófagos, linfócitos, e destruição tecidual (ROBBINS, 1986; MONTENEGRO; FRANCO, 1999; KUMAR et al., 2012; BEZERRA et al., 2014). Esta ativação ocorre por uma diversidade de mediadores inflamatórios (RUH et al., 2013; BEZERRA et al., 2014)

Durante a inflamação algumas células, principalmente macrófagos podem ser ativadas através do reconhecimento de uma endotoxina patogênica chamada lipopolissacarídeo (LPS), pelo receptor de tipo pedágio dos macrófagos (TLR). Este evento desencadeia uma via de sinalização que libera o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa-cadeia leve-potenciador de células B ativadas), um fator de transcrição que é responsável pela ativação de genes associados à transcrição de mediadores inflamatórios, tais como as interleucinas (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-13, IL-10, que ativam células inflamatórias, e as citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) que ativam células endoteliais e tissulares, prostaglandinas (PGs), e enzimas inflamatórias, tais como a sintase induzível (iNOS) responsável pela síntese de óxido nítrico (NO $\cdot$ ) e ciclooxigenases (COXs). O fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento epidérmico (EGF) estimulam a proliferação de fibroblastos, secreção de matriz e induzem o recrutamento de leucócitos (FRIEDMAN; HUGHES, 2002; RUBIN et al., 2006; AARABI et al.,

2007; ROCK; KONO, 2008; PROELL et al., 2008; RIBEIRO et al., 2010; KUMAR et al., 2012; RUH et al., 2013).

A via de sinalização TLR também desencadeia a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são produzidas, essencialmente, durante a fosforilação oxidativa e por ativação de células fagocíticas durante uma explosão oxidativa. A produção excessiva de ROS e a peroxidação lipídica podem levar ao dano em lipídios, proteínas, membranas, ácidos nucleicos e também serve como um importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias. Inúmeros estudos demonstram o envolvimento de ROS nos processos inflamatórios, como na patogênese das artropatias crônicas inflamatórias, como a artrite reumatoide. Acredita-se que as ROS possam atuar como segundos mensageiros para ativação do fator de transcrição NFκB, que orquestra a expressão de vários genes que perpetuam a resposta inflamatória (SURH, 2005; FILIPPIN et al., 2008).

A superprodução desses mediadores, como ocorre na inflamação crônica, tem sido associada à ocorrência de doenças crônicas degenerativas como artrite reumatóide, arteriosclerose, asma, doença de Alzheimer, lúpus eritematoso sistêmico, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, doenças pulmonares, doenças neurológicas e câncer entre outros (LIMA et al., 2007; ROCK; KONO, 2008; BEZERRA et al., 2014).

As doenças das articulações agudas e crônicas apresentam a inflamação articular como o principal sintoma clínico. Artrite é o termo genérico que atinge várias doenças articulares onde envolve inflamação de uma ou mais articulações ou do sistema musculoesquelético. A forma mais comum é a artrite reumatoide (AR) ou osteoartrose (OA), também denominada de artrose (CONTE et al., 2015; CROSS et al., 2014). A AR é uma artropatia inflamatória sistêmica que se manifesta como fadiga, dor, anorexia, astenia e atinge, principalmente, as articulações periféricas de modo simétrico, iniciando pelas articulações dos dedos, mãos e pés, evoluindo para articulações maiores, como

ombros e joelhos até o aparecimento da rigidez e inflamação da membrana sinovial (sinovite), levando a destruição celular (ABBAS et al., 2008; HOLMQVIST et al., 2010; MOTA et al., 2011).

A poliartrite visualizada na AR ocorre por causa do desenvolvimento do processo inflamatório na membrana sinovial devido às respostas imunológicas reguladas por mecanismos de vias de sinalização intracelular e regulação da expressão gênica. O destaque nessa regulação é a ativação do fator nuclear de transcrição kappa B (NF- $\kappa$ B) – capaz de controlar a expressão de TNF $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17), síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), ativação do metabolismo do ácido araquidônico (AA), indução de resposta da fase aguda e ativação dos neutrófilos e macrófagos, que levam ao aumento na liberação de mediadores como o óxido nítrico (NO $\cdot$ ), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), e formação de radicais livres conduzindo ao estresse oxidativo que amplifica a inflamação e ocasiona a destruição articular, dor e edema (THOMSON et al., 2003; SWEENEY; FIRESTEIN, 2004; KUKAR et al., 2009; HOLMQVIST et al., 2010; PAIVA et al., 2011; ABBAS et al., 2008; KOURILOVITCH et al., 2014).

### **2.3 Úlcera péptica**

A úlcera péptica (UP) ou enfermidade ulcerosa péptica é uma afecção heterogênea, multifatorial, que acomete 15% a 20% da população mundial. A úlcera é denominada péptica porque ocorre em sítios expostos à secreção de ácido clorídrico e pepsina (MOREIRA; SAN ROMÁN, 2004; ORÍA; BRITO, 2016). A UP é uma lesão em forma de ferida mais ou menos profunda na camada mais superficial (denominada mucosa) que recobre o tubo digestivo. Quando esta lesão se localiza no estômago se

denomina úlcera gástrica e quando aparece na primeira porção do intestino delgado é chamada de úlcera duodenal (MOREIRA; SAN ROMÁN, 2004).

Em 90% dos casos, a UP é uma lesão única raramente dupla ou múltipla. Na maioria das vezes, apresenta-se como lesão arredondada ou ovalada, com diâmetro variando de 0,5 a 2,0 cm e bordas regulares, pouco elevadas e cortadas a pique, tendendo a se afunilar na medida em que se aprofundam na parede do órgão. O fundo é geralmente limpo, mas pode estar coberto por material brancacento, por tecido de granulação avermelhado ou por tecido fibroso. A lesão pode estar restrita à submucosa, ou atingir a *muscularis mucosae*, serosa ou a cápsula ou parênquima de um órgão vizinho. De acordo com a profundidade da lesão e a intensidade da reação conjuntiva, a UP pode ser classificada em superficial, localizada na submucosa; profunda, quando atinge a lâmina própria; perfurante, quando ultrapassa todas as camadas da parede e se abre na cavidade peritoneal e penetrante, quando além de ultrapassar todas as camadas fica tamponada por órgãos vizinhos (pâncreas e fígado). A úlcera gástrica (UG) costuma apresentar dimensões maiores do que a duodenal (UD) (ORÍÁ; BRITO, 2016)

A fisiopatologia da úlcera péptica pode ser considerada um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa e fatores agressores da mucosa (bicarbonato, muco gástrico, o fluxo sanguíneo da mucosa, os fosfolipídios tensoativos, as prostaglandinas (PG), óxido nítrico (NO·), os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, diferentes peptídeos e fatores de crescimento) e fatores agressivos (ácido clorídrico, pepsina, radicais livres e oxidantes, os leucotrienos, a bile refluída e endotelinas) (KANGWAN et al., 2014; FARZAEI et al., 2015; ORÍÁ; BRITO, 2016).

A regulação da secreção de ácido pelas células parietais é especialmente importante na patogênese da úlcera péptica e constitui um alvo para a ação de fármacos. A secreção das células parietais é uma solução isotônica de HCl (150 mmol/L) com pH abaixo de 1. De modo bastante simplificado, íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) são transportados

ativamente do plasma para a célula parietal. Esta secreção de íons  $\text{Cl}^-$  acompanhada por íons  $\text{K}^+$ , que são, então, trocados por íons  $\text{H}^+$  pela  $\text{K}^+ \text{H}^+$  ATPase (bomba de prótons). Tem-se então a combinação de íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), seguido de sua liberação pelas glândulas secretoras gástricas (BRAGA et al., 2011). Embora a doença ulcerosa péptica seja multifatorial, o *Helicobacter pylori* é o principal fator da úlcera péptica, dispepsias, gastrite crônica e câncer gástrico (URGESI et al., 2012; IIZASA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016).

O *H. pylori* é uma bactéria espiralada Gram-negativa (YAMAOKA, 2010) que pode estar presente no muco que cobre a superfície do estômago e que causa gastrite crônica, provocando erosões e úlceras no estômago, especialmente nas pessoas de idade avançada (MOREIRA; SAN ROMÁN, 2004; MATSUDA et al., 2010; BRAGA et al., 2011; ORIÁ; BRITO, 2016). A *H. pylori* tem a capacidade de habitar no estômago devido a sua capacidade em produzir a enzima urease, que converte a uréia em amônia que por sua vez, protege a bactéria no meio ácido do estômago o que leva a alcalinização da superfície do epitélio, o aumento significativo do pH no lúmen gástrico gerando o aumento da síntese e liberação de somastatina pelas células D, substância que inibe a secreção gástrica por impedir a liberação de histamina e gastrina responsáveis pela produção do ácido clorídrico (CHAN; LEUNG, 2002; MALFERTHEINER et al., 2009; IIZASA et al., 2015; ORIÁ; BRITO, 2016).

A infecção por *H. pylori* pode ser responsabilizada por 90-95% das UD e 70-75% das UG. A erradicação do microrganismo reduz dramaticamente a taxa de recorrência da doença para 5% ao ano, em contraposição a taxas de 70-85% observadas nos tratamentos convencionais adotados que não visam erradicação do *H. pylori*, (ORIÁ; BRITO, 2016). O segundo fator etiológico para o desenvolvimento de úlcera péptica consiste no uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) não seletivos para COX-2 (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007; ORIÁ; BRITO, 2016).

A célula parietal é responsável pela secreção gástrica de ácido clorídrico em decorrência da ativação da  $H^+ K^+$  ATPase, denominada bomba de prótons, que se localiza na membrana luminal da célula, e constitui a etapa inicial da secreção ácida. A secreção gástrica de ácido é regulada por três vias, tendo como agonistas a acetilcolina (via neuronal); a histamina (via parácrina) e a gastrina (via endócrina). Esses mediadores interagem com receptores acoplados a duas importantes vias sinalizadoras: adenilato ciclase, no caso da histamina e cálcio intracelular no caso da gastrina e acetilcolina. A acetilcolina liberada por neurônios pós-ganglionares do nervo vago estimula diretamente a secreção do ácido, atuando em receptores muscarínicos M3 localizados na membrana basolateral da célula parietal e, indiretamente, por inibição da secreção de somatostatina cuja função é inibir a liberação de histamina pelas células semelhante a enterocromafina (ECL) e de gastrina pelas células G localizadas na região do antro gástrico (ORÍÁ; BRITO, 2016).

A histamina gerada pela descarboxilação da L-histidina sob ação catalítica da enzima histidina-descarboxilase (HDC), estimula a secreção gástrica de ácido depois de se ligar aos receptores de histamina-2 ( $H_2$ ) localizados nas células parietais, desencadeando uma cascata de eventos, que resulta no aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A histamina estimula, ainda, a secreção gástrica de ácido de maneira indireta, ao inibir a secreção de somatostatina pelas células D localizadas no antro gástrico e por estimular a liberação de gastrina pelas células G. A gastrina é o principal estimulador da secreção ácida durante a ingestão de alimentos, e age principalmente liberando histamina das células ECL localizadas no corpo e fundo do estômago. A gastrina liga-se a receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK-2), localizados nas células ECL e também nas células parietais. A ativação dos receptores CCK-2 localizados nas células ECL parece ser a principal via pela qual a gastrina estimula a secreção ácida (ORÍÁ; BRITO, 2016).

A produção contínua de prostaglandinas (principalmente PGE2 e PGI2), sintetizadas na mucosa gástrica principalmente pela enzima ciclooxigenase-1 (COX-1), estimula a secreção de muco e de bicarbonato, diminuem a secreção de ácido e causam vasodilatação mantendo a integridade da mucosa e proteção contra agentes que causam lesão epitelial (BRAGA et al., 2011; ORIÁ; BRITO, 2016). Isto provavelmente explica a capacidade de muitos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inespecíficos de causarem sangramento e erosões gástricas, visto que são inibidores da COX-1 (BRAGA et al., 2011). Prostaglandinas inibem ainda a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas ao endotélio vascular. O óxido nítrico no trato gastrointestinal atua na manutenção da homeostase pelo seu papel citoprotetor e regulador do fluxo sanguíneo (ORIÁ; BRITO, 2016).

A terapia da úlcera péptica alia a redução da secreção de ácido gástrico usando antagonistas dos receptores H2 (cimetidina, renitida, histidina e famotidina) ou IBPs, bem como a neutralização do ácido secretado com antiácidos (hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio e bicarbonato de sódio) e protetores da mucosa, como o sucralfato. Embora os antiácidos tenham sido utilizados ao longo do tempo e tenham provado ser relativamente eficazes, o seu uso é inconveniente devido à necessidade de várias doses diárias e também pela associação a efeitos colaterais indesejados (BRAGA et al., 2011).

No caso de infecção por *H. pylori* são associados antissecretores e antibióticos (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tinidazol, tetraciclina e fluorquinolonas, como levofloxaxino e moxifloxacino). O tratamento conhecido como terapia tríplice (combinação de um IBP, claritromicina e amoxicilina) começou a apresentar evidências de resistência microbiana por volta do ano 2000, com taxas de cura inferiores a 80%. Atualmente, os estudos apontam para a eficácia de terapia concomitante (associação de amoxicilina, claritromicina, tinidazol ou metronidazol e IBP, por 14 dias), terapia



sequencial (amoxicilina + IBP/5 dias, seguida de claritromicina e tinidazol ou metronidazol + IBP/5 dias), terapia concomitante combinada (combinação das duas citadas anteriormente) ou ainda, terapia com bismuto (associação de bismuto, tetraciclina, metronidazol + IBP). A terapia tríplice ainda permanece como alternativa quando há evidências de susceptibilidade à claritromicina (BRAGA et al., 2011).

## 2.4 Química e farmacologia do óleo-resina de copaíba

O óleo de copaíba é um óleo-resina composto de ácidos resínicos e substâncias voláteis (KOBAYASHI et al., 2011). O óleo-resina da espécie *Copaifera multijuga* Haynes (Leguminosae-Caesalpinoideae) é extensivamente comercializado no Brasil, como cápsulas ou óleo bruto para o tratamento de vários distúrbios (GOMES et al., 2010). Comparação das composições de óleo-resina de *Copaifera guianensis* Desf. e *Copaifera duckei* Dwyer, e da mais conhecida *Copaifera multijuga* Hayne, todos de ocorrência comum na Amazônia brasileira, mostra uma significativa variabilidade química não apenas entre espécies, mas também dentro de uma dada espécie e até em uma mesma árvore individual (CASCON e GILBERT, 2000). Por isso, a falta de padronização desses óleos constitui uma barreira à sua comercialização mais ampla (SOUZA BARBOSA et al., 2013).

A análise química do óleo *Copaifera multijuga* Hayne realizada, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, mostrou que o óleo é composto de sesquiterpenos com predominância do  $\beta$ -cariofileno (36,0%) e óxido de cariofileno, os quais fazem parte da composição química e podem ser utilizados como padrões químicos de copaíba (KOBAYASHI et al., 2011; SOUZA BARBOSA et al., 2013) e, no estudo, em três amostras do óleo-resina os teores de  $\beta$ -cariofileno foram respectivamente, 57,5%, 19,7% e 40,9% (VEIGA JUNIOR et al., 2007), seguido de  $\alpha$ -

humuleno,  $\alpha$ -copaeno (18,8%),  $\beta$ -bisaboleno (8,5%),  $\alpha$ -*trans*-bergamoteno (7,0%),  $\delta$ -cadineno (VEIGA JUNIOR et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2011). Entre os diterpenos, ácido copálico (6,2%) foi o principal componente da *Copaifera multijuga* Hayne encontrado em todos os óleo-resinas estudados (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

A atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba foi a propriedade mais estudada (BASILE et al., 1988). O óleo-resina de espécies de *Copaifera* brasileiras inibiu significativamente o edema de pata induzida por carragenina após doses orais de 0,70-2,69 ml/kg, mas foi um pouco menos eficaz do que 50 mg/kg de fenilbutazona cálcica. A administração repetida do óleo-resina a uma dose de 1,26 ml/kg por um período de 6 dias reduziu a formação de granuloma a uma resposta comparável a de 20 mg/kg de fenilbutazona cálcica. Esta mesma dose de óleo-resina, igualmente, reduziu a permeabilidade vascular para histamina intercutânea. Os valores da DL<sub>50</sub> do óleo-resina da copaíba encontram-se na Tabela 1, cujos resultados dão suporte experimental para utilização na medicina popular brasileira como um produto anti-inflamatório (BASILE et al., 1988).

**Tabela 1 - Valores da DL<sub>50</sub> do óleo-resina de copaíba obtido de diferentes espécies de copaíba**

Óleo-resina	Animal	DL50 Via Oral	Referência
<i>Copaíba</i> spp.	Rato	3,79 (3,21-4,471) ml/kg	· BASILE et al. (1988) ·
<i>Copaiba</i> spp.	Rato	6.309,09 mg/Kg	*
<i>C. reticulata</i>	Rato	4,48 ml/Kg	·RIO (2001) ·
<i>C.reticulata</i>	Rata	>2000 mg/Kg **	·CAMILE et al. (2009) ·
<i>C. langsdorfii</i>	Camundongo	8,45 ml/Kg	·CHEN-CHEN e SENA (2002) ·
<i>C. multijuga</i>	Rato	Até 4,0g/Kg sem morte	·GONÇALVES e WANDERLEY (2014) ·
<i>C. duckei</i>	Rato	3758,16 mg/Kg	·LIMA (2014) ·

\* Disposições 1910.1200 do título 29 do Código de Regulamentos Federais dos EUA.

\*\* Dose letal classificada como categoria 5, segundo o Guia OECD 423.

O estudo da atividade anti-inflamatória do óleo em ratos utilizando o modelo de edema induzido por carragenina mostrou inibição do edema e inibiu a formação de granuloma no modelo “Cotton-pellet” aumentando a permeabilidade vascular, mostrando resultados com indicação de atividade anti-inflamatória. O estudo comparativo das atividades analgésica e anti-inflamatória do óleo-resina de *C. cearensis* com os derivados isolados de óleo-resina de copaíba (ácido copálico, éster metílico do ácido solidago e bisabolol) e da substância indometacina mostrou resultados maiores em relação aos derivados isolados, porém, menor que a da indometacina (FERNANDES et al., 1992). A avaliação das propriedades cicatrizantes de feridas e úlceras utilizando óleos de copaíba de origem comercial em modelo de ferida aberta apresentou aumento do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, porém diminuição da quantidade de fibras colágenas (BRITO et al., 1998; BRITO et al., 1999a). Os óleos de *Copaifera langsdorfii*, se mostraram, no mesmo modelo bastante ativos em ratos e apresentaram resistência à tensão e úlcera crônica de estômago induzida por ácido acético (PAIVA et al., 2000). O pré-tratamento com óleo de *Copaifera langsdorfii* em doses a partir de 400 mg/kg protegeu a mucosa gástrica dos ratos de lesões induzidas por etanol e indometacina devido provavelmente à diminuição de acidez gástrica e da promoção da secreção de muco gástrico e bicarbonato (PAIVA et al., 1998).

Amostras de oito óleos de copaíba comerciais usados na região amazônica como agentes anti-inflamatórios e disponíveis nos mercados populares foram testados *in vivo* e inibiram significativamente a formação de edema induzido por bradicinina e pela carragenina em ratos. Duas amostras destes óleos com efeitos anti-inflamatórios foram fracionadas e detectadas vários sesquiterpenos e diterpenos. Isto sugere que os sesquiterpenos presentes nos óleos de copaíba podem ser responsáveis pela ação anti-inflamatória relatada na medicina popular (VEIGA et al., 2001). Duas amostras de óleos coletados da mesma árvore *Copaifera multijuga* Hayne, mas em diferentes períodos do

ano, foram fracionados e as frações hexano, diclorometano e metanol obtidos de um desses óleos-resinas foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, sendo identificados vinte e sete sesquiterpenos e seis diterpenos, onde os principais componentes foram o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e ácido copálico. As frações diclorometano e metanol foram administradas por via intraperitoneal e causaram uma inibição significativa do edema da pata causada por carragenina com a inibição de  $49 \pm 13\%$ ,  $64 \pm 9\%$ , respectivamente. Da mesma forma, a droga controle positivo dexametasona também inibiu significativamente a formação de edema de pata induzido por carragenina ( $60 \pm 4\%$  em 2 horas). A fração hexano também inibiu significativamente ( $50 \pm 6\%$ ) a formação do edema da pata causada por bradicinina. Estes resultados sugerem a presença de compostos terpênicos ativos ainda não identificados no óleo de *C. multijuga* que exibiu propriedades anti-edematogênicas. Digno de nota, o rendimento destes compostos e as ações farmacológicas do óleo apresentaram grandes variações sazonais, um aspecto relevante que deve ser cuidadosamente observado para o uso medicinal correto desta planta pela população (VEIGA JUNIOR et al., 2006).

Estudos farmacológicos comparativos entre diferentes espécies de copaíba são raros (GOMES et al., 2007). Entre eles, três óleos-resinas de copaíba obtidos de espécies da *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke foram avaliados os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios *in vitro* através da medição da produção de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) em macrófagos murinos e *in vivo* usando o modelo de pleurisia induzida por zimosano em ratos. Os resultados mostraram que o óleo-resina da *Copaifera multijuga* Haynes (100 mg/kg) foi o mais potente, tanto inibindo a produção de  $\text{NO}\cdot$ , quanto na pleurisia induzida pelo zimosano. Os óleos-resinas de *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke

também foram capazes de inibir a produção de NO· e na pleurisia, mas com menor intensidade (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Ensaio pré-clínicos em ratos para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e ação sobre o SNC mostraram que as doses de 100 e 200 mg/kg e em uma concentração de 200 µl/ml do óleo destilado de copaíba apresentaram efeitos anti-inflamatórios tanto *in vivo* quanto *in vitro* com base na redução da migração de leucócitos para a cavidade pleural dos ratos e a solução quimiotática de lipopolissacarídeo, respectivamente. A investigação sobre os efeitos no SNC mostrou redução sobre as atividades locomotoras e exploratórias e aumentou a ansiedade dos animais nas doses de 100 e 200 mg/kg. Os resultados obtidos sugerem que do óleo de copaíba tem efeito anti-inflamatório e um importante e interessante efeito no sistema nervoso central (KOBAYASHI et al., 2011).

Estudo comparativo da atividade anti-nociceptiva de dois óleo-resinas de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) administrados por via oral, utilizando modelo periférico (contorção abdominal induzida por ácido acético e formol), da coluna vertebral (retirada de cauda) e supra-espinhal (placa quente) mostraram que os óleos de copaíba não desenvolveram efeitos tóxicos. As doses que variaram de 30 a 150 mg/kg foram suficientes para desenvolver significativamente efeito anti-nociceptivo periférico. Todos os óleos de copaíba demonstraram a atividade central, mas com menos efeitos sobre as regiões supra espinhal do cérebro. A administração do antagonista do receptor de opioide naloxona inibiu completamente o efeito anti-nociceptivo induzido por ambas as copaíbas. Os resultados indicaram que os óleos-resinas de copaíba possuem efeitos anti-nociceptivos central e periférico. Este novo efeito comprova que pode ser útil no tratamento de desordens algésicas (GOMES et al., 2007).

Estudos farmacológicos para elucidar o mecanismo de ação central do óleo de copaíba, utilizando modelos para analgesia (contorções induzidas por ácido acético e

de retirada da cauda) ou inflamação (edema da pata de rato e aumento da permeabilidade vascular) realizados em três frações obtidas a partir de óleo-resina *Copaifera multijuga*, hexano (HF), clorofórmio (CF), e metanol (MF), representando as três principais classes de substâncias do gênero *Copaifera* (hidrocarbonetos sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e diterpenos azídicos), nas doses que variaram entre 1 e 150 mg / kg, do óleo-resina *Copaifera multijuga* (OCM, 100 mg / kg, p.o.) e o fármaco de referência morfina (5 mg/kg, po). Todos os animais foram pré-tratados com naloxona (antagonista de receptor opióide, 5mg/kg, ip) (GOMES et al., 2010). As frações inibiram significativamente de maneira dose-dependente, o número de contorções induzidas por ácido acético e a segunda fase de resposta de lambeo induzido pela formalina. Resultados similares foram observados no modelo de retirada da cauda. O efeito anti-nociceptivo central para HF e CF, nas doses de 50 e 100 mg/kg foi mais elevada do que a observada com a morfina (1 mg/kg). A administração de naloxona inibiu o efeito anti-nociceptivo de frações indicando que HF, CF, e MF podem estar agindo em receptores opióides. Todas as três frações inibiram o edema da pata de rato e aumentaram a permeabilidade vascular induzida por vários agentes flogísticos (carragenina, histamina e serotonina). Os resultados indicam que as frações obtidas a partir de *Copaifera multijuga* Hayne mostraram efeito anti-nociceptivo provavelmente mediado pelos receptores opiáceos e atividade anti-inflamatória através da inibição dos precursores histaminérgicos e serotoninérgicos (GOMES et al., 2010).

Os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do copaíba óleo-resina (COR) foram investigados na sequência de um dano agudo após a desordem neural provocadas em ratos adultos com relação ao córtex motor. Nos animais foi injetada a neurotoxina *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (n = 10) e tratou-se com uma única dose de COR (400 mg/kg, i.p.) logo após a cirurgia (Grupo 1) ou com duas doses diárias (200 mg/kg, i.p.) durante três dias (Grupo 2) para alterar lesão. Os animais de

controle foram tratados apenas com veículo. Tratamento COR induziu a preservação tecidual e diminuição do recrutamento dos neutrófilos e a ativação da micróglia no local da lesão em comparação aos animais controle. Os resultados sugerem que o tratamento COR induz neuroproteção por modulação da resposta inflamatória no seguimento do dano agudo do sistema nervoso central (GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012).

A copaíba *Copaifera langsdorfii* Desf. e outras espécies afins, por via oral tem sido indicada no tratamento auxiliar de hemorroidas e dores localizadas no intestino, tomando-se 5 até 60 gotas, duas a três vezes por dia, misturados no leite ou no mel de abelhas, diminuindo-se o número de gotas se aparecerem sintomas secundários desagradáveis como náusea, mal-estar do estômago e diarreia (ABREU MATOS, 2002).

Ensaio clínico para avaliar a segurança clínica do uso de uma formulação fitoterápica composta da associação de *Mikania glomerata* Spreng, *Mentha piperita* L., *Eucalyptus globulus* Labill. e *Copaifera multijuga* Hayne, incorporadas à própolis e mel para tratar doenças respiratórias em estudo aberto, mostrou que o xarope foi bem tolerado e que alguns eventos adversos foram relatados, sendo classificados como possivelmente ou não atribuídos ao fitoterápico. Os índices de hemoglobina, TGO, TGP, creatinina e leucócitos não apresentaram diferenças significativas em relação ao pré-estudo. Todos os parâmetros laboratoriais estiveram dentro das suas respectivas faixas de normalidade. Os exames clínicos, eletrocardiográficos e laboratoriais não evidenciaram sinais de toxicidade nos órgãos e sistemas avaliados (TAVARES et al., 2006).

Em um estudo clínico foi verificada a eficácia cicatrizante do óleo-resina de copaíba, administrado por via oral e obtido da *Copaifera officinalis* formulada em cápsulas de 80 mg e 120 mg, comparado com o omeprazol 20 mg, em 60 pacientes com diagnóstico definitivo de úlcera péptica. Os resultados mostraram 65 a 75% cicatrização

da úlcera e sem efeitos adversos significativos (ARROYO-ACEVEDO et al., 2011) no grupo usuário de copaíba.

## 2.5 Química e atividade farmacológica de sesquiterpenos

Os terpenóides são um grupo homogêneo de moléculas que podem ser identificadas e classificadas devido ao arranjo dos esqueletos e do número de átomos de carbono: em monoterpenos (10 carbonos átomos de carbono), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono), sesterterpenos (25 átomos de carbono) e triterpenos (30 átomos de carbono). Os sesquiterpenóides (C-15) formam um grupo imenso de produtos naturais (NPs) com uma variedade estrutural extraordinária (KLAPSCHINSKI et al., 2016; BROCKSON et al., 2017).

As lactonas sesquiterpênicas são profundamente estudadas farmacologicamente (HERNÁNDEZ et al., 2005) e possuem uma variedade de atividades biológicas (FELTENSTEIN et al., 2004). As atividades anti-inflamatórias de algumas plantas medicinais são atribuídas ao seu conteúdo de lactonas sesquiterpênicas (VALÉRIO et al., 2007). As lactonas sesquiterpênicas contendo uma porção alfa-metileno-gama-lactona mostraram ser potentes inibidores do edema induzido por carragenina e da artrite crônica induzida por adjuvante em roedores (HALL et al., 1980) e são potentes estimuladores da degranulação de mastócitos. Esse fenômeno pode ter um papel significativo na toxicidade de algumas lactonas sesquiterpênicas de plantas venenosas quando ingeridas pelo gado (ELISSALDE et al., 1983). As lactonas sesquiterpênicas da *Neurolaena lobata*, planta medicinal do Caribe usada para o tratamento de várias condições incluindo inflamação, interferiram na indução celular inflamatória, na adesão de moléculas e quimiocinas em células estimuladas com produtos bacterianos e citocinas. O efeito foi confirmado *in vivo*, o que aumenta o interesse no potencial



terapêutico dos compostos para o tratamento de doenças inflamatórias (McKINNON et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória contra granulomas em peletes de algodão em ratos, foi altamente significativa pelas lactonas sesquiterpênicas vicólides C e D, isoladas a partir da *Vicoa indica* e pode ser atribuída às suas estruturas químicas. O vicólido D possui atividade antipirética (ALAM et al, 1992). Verificou-se que a santonina, uma lactona sesquiterpênicamente encontrada nas plantas da família *Compositae*, mostra uma atividade anti-inflamatória significativa nos processos inflamatórios agudos. O perfil de atividade da santonina assemelhou-se muito ao diclofenaco de sódio, um fármaco anti-inflamatório não esteroide padrão. A santonina causou um efeito antipirético significativo em camundongos, que se verificou ser independente da via de administração do fármaco. Também aumentou o tempo de reação da placa quente em ratos tratados de forma similar a da morfina (AL-HARBI et al., 1994).

Os produtos naturais biologicamente ativos continuam a ser úteis na exploração e controle de processos de sinalização intracelular. Por exemplo, a partenolida uma lactona sesquiterpênicamente da erva medicinal anti-inflamatória matricaria (*Tanacetum parthenium*) parece inibir a via de sinalização pró-inflamatória. Partenolida tem alvo molecular direto sobre o complexo da quinase que proporciona possivelmente as propriedades anti-inflamatórias da substância. Além disso, estes resultados podem ser úteis no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios futuros (KWOK et al., 2001). Os resultados revelaram que o tratamento oral com o  $\alpha$ -humuleno e *trans*-cariofileno dois sesquiterpenóides isolados do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, exibiram marcados efeitos inibitórios em diferentes modelos experimentais inflamatórios em camundongos e ratos e que podem representar ferramentas importantes para o manejo e/ou tratamento de doenças inflamatórias (FERNANDES et al., 2007).

## 2.6 Química e atividade farmacológica do $\beta$ -cariofileno

Alimentos inteiros à base de plantas fornecem milhares de metabólitos bioativos à dieta humana com redução do risco de desenvolver doenças crônicas (CALLEJA et al., 2013). O  $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -Car) pertence à classe química dos sesquiterpenos (PINHO et al., 2012) é um sesquiterpeno bicíclico (*trans*-4, 11,11-trimetil-8-metilenobiciclo [7,2,0] undec-4-eno), natural, com baixa toxicidade (CHANG et al., 2013) amplamente distribuída em óleos essenciais de várias plantas, vegetais, frutas, ervas medicinais, plantas comestíveis, especiarias e como aditivo alimentar aprovado pela FDA (Di SOTTO et al., 2010; HORVÁTH et al., 2012; CALLEJA et al., 2013; PANT et al., 2014). O  $\beta$ -Car possui uma vasta gama de atividades biológicas e estudos clínicos mostraram que ele é potencialmente eficaz como antioxidante, antibiótico, anestésico local e agente anti-inflamatório (LEGAULT; PICHETTE, 2007; REINSVOLD et al., 2011; PANT et al., 2014), anticancerígeno devido à sua capacidade para induzir enzimas desintoxicantes *in vitro* e *in vivo*. Apresentou citotoxicidade contra tumores (Di SOTTO et al., 2010), atividade neuroprotetora (OLIVEIRA et al., 2016) e tem sido usado tradicionalmente na indústria de cosméticos e perfumes por fornecer um aroma amadeirado e picante (REINSVOLD et al., 2011). Na indústria de alimentos é usado desde o ano de 1930 como agente flavorizante. É um antioxidante natural que reduz a fibrose hepática mediada por tetracloreto de carbono e inibe a ativação das células hepáticas (CALLEJA et al., 2013).

O óleo volátil dos rizomas de *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell é uma rica fonte natural única em cariofileno, tendo como seus principais constituintes os cariofilenos isoméricos,  $\beta$ -cariofileno (42,2%),  $\alpha$ -humuleno e  $\alpha$ -cariofileno (27,7%), juntamente com vestígios de isocariofileno. A atividade antimicrobiana do óleo foi

testada contra bactérias e fungos patogênicos humanos e vegetais. O óleo apresentou atividade inibitória significativa contra os fungos *Candida glabrata*, *C. albicans* e *Aspergillus niger* e as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Não se observou qualquer atividade contra o fungo *Fusarium oxysporum* (SABULAL et al., 2006).

Do óleo essencial das folhas de *Didymocarpus tomentosa* foram identificados 25 constituintes, representando 81,6% do óleo. O óleo essencial da folha de *D. tomentosa* foi extraído por hidrodestilação e analisado por CG/FID e CG/EM, contém 78,7% de sesquiterpenos e 2,9% de monoterpenos, e é uma fonte natural rica em cariofileno, contendo  $\beta$ -Car, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e óxido de humuleno. A atividade citotóxica do óleo foi determinada pelo BSLT utilizando larva de camarão e o ensaio MTT utilizando linha celular de tumor HeLa. O óleo apresentou atividade citotóxica significativa com valores de  $CL_{50}$  e  $IC_{50}$  de 12,26 e 11,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (GOWDA et al., 2012). *Aegle marmelos* (Bael indiano) é uma árvore que pertence à família de Rutaceae que possui uma posição de destaque tanto na medicina como na cultura indiana. A análise por citometria de fluxo revelou que a concentração ótima (50  $\mu\text{g/ml}$ ) de frações de  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno do extrato de *A. marmelos* pode induzir a apoptose na linha celular Jurkat. Assim, o  $\beta$ -Car e o óxido de cariofileno isolados de *A. marmelos* podem atuar como potentes agentes anti-inflamatórios e moduladores de um alvo terapêutico recém-estabelecido a 15-lipoxigenase (15-LOX). O  $\beta$ -Car e o óxido de cariofileno podem induzir a apoptose em células de linfoma e neuroblastoma via modulação de 15-LOX (alvo ascendente) seguido pela regulação negativa de anti-apoptóticos e regulação positiva de genes pró-apoptóticos (SAIN et al., 2014).

Evidências crescentes sugerem que os extratos derivados de plantas e seus componentes isolados são úteis para o tratamento de convulsões e, portanto, constituem

uma fonte valiosa de novos fármacos antiepilépticos com eficácia melhorada e melhor perfil de efeitos adversos. Os dados sugerem que o  $\beta$ -Car apresenta atividade anticonvulsiva contra as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. Uma vez que não foram observados efeitos adversos na mesma gama de doses do efeito anticonvulsivo, o  $\beta$ -Car deve ser avaliado no tratamento de convulsões (OLIVEIRA et al., 2016).

As folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Manacá) são usadas na medicina popular para tratar doenças renais e hepáticas, dor de estômago, dores de cabeça e reumatismo. Foi descrito um efeito depressor do sistema nervoso central (SNC) da fração hexânica a partir do extrato etanólico desta planta. O  $\beta$ -Car é o principal componente desta fração hexânica. Na avaliação da atividade farmacológica do óleo essencial obtido de folhas de *S. odoratissima* (EO) e seu principal componente no SNC de camundongos, os resultados sugerem que o óleo essencial derivado de *S. odoratissima* produz um efeito ansiolítico sem alterar o desempenho motor e que esse efeito é mediado por 5-HT (1A), mas não por receptores de benzodiazepina. Além disso, o componente principal,  $\beta$ -Car, também tem um efeito de tipo ansiolítico que pode contribuir para os efeitos de EO, mas este efeito não parece ser mediado via receptores 5-HT (1A) ou benzodiazepínicos (GALDINO et al., 2012).

O óleo essencial obtido das folhas de *Bidens sulphurea* (Asteraceae) apresentou atividade moderada contra *Streptococcus mutans* (MIC = 250  $\mu$ g/mL) e atividade significativa contra *Streptococcus mitis* (MIC = 31,25  $\mu$ g/mL). Germacreno D (38,3%),  $\beta$ -Car (18,0%),  $\beta$ -elemeno (13,9%) e biciclogermacreno (13,1%) foram identificados como os principais componentes químicos deste óleo (AGUIAR et al., 2013)

O  $\beta$ -Car (10 mg/kg) reduziu significativamente em 67% o volume do enfarte cortical quando administrado previamente antes da oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Estas descobertas sugerem que o  $\beta$ -Car tem uma potente atividade

neuroprotetora e a sua neuroproteção pode estar parcialmente relacionada com a modulação de mediadores inflamatórios (CHANG et al., 2013).

Muitos estudos têm demonstrado que os agentes anti-inflamatórios são eficazes no tratamento da endometriose. O  $\beta$ -Car exerceu um potente efeito anti-inflamatório *in vivo*. Na investigação do efeito do  $\beta$ -Car na endometriose e na fertilidade e reprodução em ratas adultas, não foi observada diferença estatisticamente significativa em qualquer parâmetro estudado entre os grupos de controle e os grupos tratados com  $\beta$ -Car no estudo de fertilidade. Terapia com  $\beta$ -Car pode apresentar uma nova opção terapêutica promissora, não tóxica para pacientes com endometriose (ABBAS et al., 2013).

As atividades biológicas do  $\beta$ -Car no músculo liso das vias aéreas em banho isolado para investigar o efeito sobre o tônus basal, demonstraram que o transcariofileno possui atividade antiespasmódica no músculo liso traqueal do rato o qual poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  dependente da tensão (PINHO et al., 2012).

A doença periodontal é altamente prevalente e afeta muitos cães, atingindo até 85% de prevalência em indivíduos com idade superior a 4 anos. Atualmente a clorexidina é a droga de escolha para combater a formação de placa dentária nestes animais, o agente etiológico da doença, porém, possui relatos de vários efeitos secundários. Desta maneira, em todo o mundo são conduzidas pesquisas a fim de identificar potenciais substitutos para a terapia antimicrobiana e prevenção da doença periodontal. Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana de  $\beta$ -Car contra bactérias da placa dentária do cão *in vitro* e *in vivo*, mostraram que o  $\beta$ -Car tem atividade antimicrobiana contra a proliferação de bactérias formadoras de placas dentárias de cães, representando uma alternativa adequada ao uso de clorexidina na profilaxia e tratamento da doença periodontal de cães (PIERI et al., 2016).

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por neurodegeneração dopaminérgica progressiva na área da substância negra compacta (SNc). Os resultados do estudo realizado para avaliar o efeito neuroprotetor do  $\beta$ -Car contra o estresse oxidativo induzido pela rotenona e a neuroinflamação em um modelo de DP em rato, demonstraram que o  $\beta$ -Car proporciona neuroproteção contra a DP induzida pela rotenona e os efeitos neuroprotetores podem ser atribuídos às suas potentes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (OJHA et al., 2016).

Cetoprofeno (Cet) é amplamente utilizado no tratamento de muitas doenças inflamatórias, mas pode induzir toxicidade hepática especialmente com overdose. A combinação do  $\beta$ -Car e da silimarina (Sily) reduziu a hepatotoxicidade induzida por Cet em ratos, associação considerado hepatoprotetora, pela capacidade antioxidante contra Cet-hepatotoxicidade induzida em ratos (KELANY; ABDALLAH, 2016). O estudo para avaliar o efeito do  $\beta$ -Car na hipercolesterolemia utilizando um modelo de hiperlipidemia induzida pelo Triton WR-1339 em ratos, bem como seu possível efeito sobre as enzimas antioxidantes hepáticas mostrou que o  $\beta$ -Car produz efeito hipolipidêmico através da inibição da HMG-CoA redutase hepática, tal qual o fármaco padrão sinvastatina, e esta inibição sugere um possível mecanismo de ação hiperlipidêmica. Assim, os resultados indicam que o  $\beta$ -Car pode ser usado no tratamento de doenças dislipidêmicas porque exerce um efeito similar ao do medicamento de referência, protegendo o fígado contra lesões lipídicas e melhorando o sistema de defesa antioxidante hepático (BALDISSERA et al., 2017). *Agastache rugosa* (Labiatae), uma erva perene espalhada por todos os campos coreanos, é amplamente consumida como um vegetal comestível natural e usada na medicina popular. O  $\beta$ -Car presente na *A. rugosa* mostrou ser hepatoprotetor contra a falência hepática induzida por D-galactosamina (GalN) e lipopolissacarídeo (LPS) em ratos (CHO et al., 2015).

O  $\beta$ -Car é uma fitomolécula bioativa conhecida por reduzir estresse oxidativo em organismos vivos (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016). O estresse oxidativo e inflamatório tem sido implicado no aparecimento e progressão do diabetes mellitus e suas complicações. Na avaliação do estresse oxidativo e inflamatório mediado pela hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), a administração do  $\beta$ -Car restaurou significativamente o estado antioxidante e diminuiu as citocinas pró-inflamatórias em ratos diabéticos. A eficácia do  $\beta$ -Car foi comparada com a glibenclamida, um fármaco antidiabético padrão (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016). Por outro lado, como a secreção de insulina é estimulada pela glicose (GSIS) e é essencial para o controle do combustível da homeostase metabólica e como seu comprometimento é um elemento-chave na falha das células  $\beta$  na diabetes tipo 2, e devido o  $\beta$ -Car ser um ativador do receptor CB2, e como os efeitos do  $\beta$ -Car sobre o GSIS ainda são desconhecidos, os resultados mostraram que o  $\beta$ -Car tem um novo papel na regulação GSIS em células  $\beta$  pancreáticas (SUIJUN et al., 2014). Estudo para avaliar os efeitos anti-hiperglicêmicos do  $\beta$ -Car administrado por via oral em ratos Wistar machos adultos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) de forma dose dependente e da glibenclamida, um fármaco padrão hipoglicêmico oral durante 45 dias diminuíram significativamente a glicose com níveis aumentados de insulina no plasma e melhoraram as atividades alteradas das enzimas metabólicas dos carboidratos até quase normal. O efeito insulínico do  $\beta$ -Car foi suportado por estudos imunohistoquímicos.  $\beta$ -Car a uma dose de 200 mg/kg p.c. exerceu efeitos antidiabéticos significativos do que as outras duas doses (100 e 400 mg/kg por via oral), assim, conclui-se que a administração de  $\beta$ -Car tem efeitos benéficos na homeostase da glicose em ratos diabéticos (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2014)

A avaliação da atividade antinociceptiva do  $\beta$ -Car em modelos de dor aguda pelo teste da placa quente (nocicepção térmica) e pelo teste de formalina (dor inflamatória) e crônica por lesão de constrição crônica (CCI) da hipernocicepção induzida pelo nervo ciático foi medida pelos testes de placa quente e von Frey em camundongos e o envolvimento do  $\beta$ -Car nos sistemas opióide e endocanabinóide. Para elucidar o mecanismo de ação, os camundongos foram pré-tratados com naloxona ou AM630 30 min antes do tratamento com *trans*-cariofileno. Posteriormente, foi avaliada a nocicepção térmica. A administração do  $\beta$ -Car minimizou significativamente a dor nos modelos de dor aguda e crônica. O efeito anti-nociceptivo observado durante o teste da placa quente foi revertido pela naloxona e AM630, indicando a participação tanto do sistema opióide como do sistema endocanabinóide. O tratamento com  $\beta$ -Car também diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$ . Estes resultados demonstram que o  $\beta$ -Car reduziu a dor aguda e crônica em camundongos, que podem ser mediados através dos sistemas opioides e endocanabinóide (PAULA-FREIRE et al., 2013). As células de microglia têm mediado à inflamação induzida pela hipóxia através da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-6.

Dado que a ativação do receptor CB2R proporciona resultados anti-oxidativos e anti-inflamatórios, suspeita-se que o seu agonista seletivo, o  $\beta$ -Car possa ter efeitos protetores contra as respostas neuroinflamatórias induzidas pela hipóxia. Estas observações indicam que o  $\beta$ -Car suprime a resposta neuroinflamatória induzida por hipóxia através da inibição da ativação de NF-kB em micróglia, sendo portanto, benéfico na prevenção da neuroinflamação induzida por hipóxia (GUO et al., 2014).

O  $\beta$ -Car é um fitocanabinóide (BENTO et al., 2011) presente no óleo essencial da *Cannabis sativa* (PAULA-FREIRE et al., 2013). No estudo que investigou a contribuição dos sistemas canabinóides periféricos (CB) e opióides na antinocicepção



produzida pela injeção intraplantar (i.pl.) do  $\beta$ -Car os resultados demonstraram que a antinocicepção produzida por i.pl. é mediada pela ativação de receptores canabinóides subtipo 2 (CB2) pelo  $\beta$ -Car, por estimular a liberação de endorfina endógena dos queratinócitos locais. As respostas sugerem que a injeção combinada de morfina e  $\beta$ -Car pode ser uma alternativa no tratamento da dor quimogênica (KATSUYAMA et al., 2013). Como os receptores endógenos CB2 são expressos em células imunes e medeiam efeitos anti-inflamatórios, o  $\beta$ -Car pode ser um excelente agente terapêutico para prevenir a nefrotoxicidade induzida por cisplatina (droga antineoplásica), através de uma via dependente do receptor CB2. Dado o excelente perfil de segurança do  $\beta$ -Car em seres humanos é de notar que ele possui um grande potencial terapêutico numa multiplicidade de doenças associadas à inflamação e estresse oxidativo (HORVÁTH et al., 2012).

Evidências recentes sugerem que os receptores de canabinóides CB2 estão implicados em distúrbios de ansiedade e depressão, embora poucos estudos sistemáticos em animais de laboratório tenham sido relatados (SANTOS et al., 2017), recentemente, demonstrou-se que o  $\beta$ -Car se liga e ativa o receptor CB2 (BENTO et al., 2011), possuindo um potente efeito agonista seletivo do receptor CB2 e em experimentos utilizando ratos adultos submetidos a modelos de efeitos ansiolíticos e antidepressivos, os resultados sugerem que os receptores CB2 podem fornecer alvos terapêuticos alternativos para o tratamento da ansiedade e da depressão. A possibilidade de que o  $\beta$ -Car possa melhorar os sintomas destes transtornos de humor oferece perspectivas emocionantes para estudos futuros (BAHI et al., 2014). O  $\beta$ -Car possui atividade neuroprotetora associada principalmente à ativação seletiva dos receptores CB2, inibição da ativação microglial e diminuição da inflamação, tais efeitos de  $\beta$ -Car e seu papel benéfico em processos neurodegenerativos devem ser investigados mais a fundo (SANTOS et al., 2017). A ativação do receptor CB2 é sugerida por desencadear a via

receptor- $\gamma$  ativada pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) e os agonistas de ambos os receptores melhoram a colite. Recentemente, demonstrou-se que o efeito anti-inflamatório de  $\beta$ -Car envolve CB2 e a via PPAR $\gamma$  e sugerem o  $\beta$ -Car como uma possível terapia para o tratamento de doença inflamatória intestinal (BENTO et al., 2011).

Vários estudos demonstraram que o CB2 está implicado criticamente na modulação de respostas de dor inflamatória e neuropática. No estudo sobre os efeitos analgésicos do  $\beta$ -Car em modelos animais de dor inflamatória e neuropática demonstrou-se que o  $\beta$ -Car administrado por via oral reduziu as respostas de dor inflamatória (fase tardia) no teste de formalina numa forma dependente do receptor CB2, ao passo que não teve qualquer efeito sobre as respostas agudas (fase inicial). Num modelo de dor neuropática, a administração oral crônica de  $\beta$ -Car atenuou a hiperalgesia térmica e alodinia mecânica, e reduziu a neuroinflamação espinhal. É importante notar que não foi encontrado sinais de tolerância aos efeitos anti-hiperalgésicos do  $\beta$ -Car após tratamento prolongado. O  $\beta$ -Car oral foi mais eficaz do que o agonista CB2 sintético JWH-133 injetado subcutaneamente. Deste modo, o produto vegetal natural  $\beta$ -Car pode ser altamente eficaz no tratamento de estados de dor prolongados e debilitantes. Esses resultados têm importantes implicações para o papel dos fatores dietéticos no desenvolvimento e modulação de condições de dor crônica (KLAUKE et al., 2014)

Em estudo sobre o efeito anti-hiperalgésico do complexo contendo  $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ CP) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) num modelo de dor muscular crônica não inflamatória induzida por injeção salina pH4 em camundongos, os resultados mostraram que o tratamento oral com  $\beta$ -Car- $\beta$ CD, em todas as doses testadas, produziu uma redução significativa na hiperalgesia mecânica e um aumento significativo nos limiares de retirada muscular, sem produzir qualquer alteração na força. Além disso, o  $\beta$ -Car-

$\beta$ CD foi capaz de diminuir significativamente a expressão da proteína Fos no corno dorsal superficial. Deste modo, o  $\beta$ -Car- $\beta$ CD atenua a dor muscular crônica não inflamatória em camundongos e inibe a expressão de Fos na medula espinhal lombar (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016).

## 2.7 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência da manipulação da matéria para produção de estruturas e dispositivos na escala nanométrica ( $10^{-9}$ ). É uma ciência multidisciplinar que tem se desenvolvido nos últimos anos, encontrando aplicações em todas as áreas do conhecimento (DIMER *et al.*, 2013). A nanotecnologia tem impactado particularmente nas ciências farmacêuticas visando desenvolver medicamentos para os mais diversos fins terapêuticos (WONG et al., 2010; DIOP-FRIMPONG et al., 2011).

O princípio da nanotecnologia baseia-se em que os materiais na escala nanométrica apresentam propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas observadas no seu estado natural, ou ainda, fenômenos que antes eram mascarados ou apresentavam menor influência sobre a matéria em escala micro ou macro, passam a predominar na escala nano. O efeito é atribuído principalmente ao tamanho reduzido, produzindo-se um grande aumento da área de superficial (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; JAGDALE et al., 2009; FIGUEIREDO, 2009; DIMER *et al.*, 2013).

Nas ciências farmacêuticas, a nanotecnologia permitiu a criação dos “nanocarreadores”, que são diferentes formas que permitem a vetorização do fármaco e a sua liberação controlada, conseguindo ainda melhorar a biodisponibilidade e a potência dos fármacos neles carregados (PIMENTEL et al., 2007; SAHOO et al., 2007). As nanopartículas (nanocápsulas, nanoesferas etc.), são capazes de proteger o fármaco contra agentes no organismo, como o pH estomacal, promovendo o aumento da eficácia

terapêutica, e diminuição da dose terapêutica. Assim, o número de administrações necessárias é menor, levando a uma melhor aceitação pelo paciente e a redução da dose, e conseqüentemente menos efeitos tóxicos e/ou adversos. (PIMENTEL et al., 2007; GOU et al., 2011; CHAUDHARI, 2012).

A maior parte dos estudos em nanotecnologia, tem sido focada no desenvolvimento de formulações para o tratamento do câncer, de doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e ao combate do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS). Na atualidade, existem mais de uma centena de estudos clínicos com produtos nanotecnológicos em andamento, sendo que a doença-alvo mais recorrente é o câncer de mama (DIMER *et al.*, 2013).

As emulsões são amplamente empregadas como veículos nas indústrias cosmética e farmacêutica, por apresentarem vantagens como a veiculação de fármacos ou ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação. Elas também permitem o controle de aspectos sensoriais adaptando-os às necessidades da via de administração (CAMARGO, 2008). As emulsões possuem uma substância (ex. óleo) dispersado em pequenas gotículas dentro de um líquido imiscível (ex. água) com ajuda de um tensoativo (FERNANDEZ et al., 2004). As emulsões são compostas basicamente de três fases: uma fase aquosa, uma fase oleosa e o tensoativo, cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento do sistema (SAJJADI et al., 2003).

Existem dois tipos clássicos de emulsões simples, do tipo óleo/água (O/A), na qual as gotículas do óleo estão dispersas na água e do tipo água/óleo (A/O), na qual as gotículas da água estão dispersas no óleo (BERNARDI, 2011). O tensoativo a utilizar em cada caso, depende do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (*EHL*), (SOUZA et al., 2009). Trata-se de parâmetros criados por GRIFFIN, 1954, em uma escala de *EHL* variando entre 0 e 20, sendo o valor de 10 o limite entre os sistemas lipofílicos e hidrofílicos. A

aplicação de cada tensoativo está relacionada com o valor do seu *EHL*, sendo que os que apresentam baixo *EHL*, são indicados para emulsões *A/O* e aqueles com valores baixos são recomendados para emulsões de tipo *O/A* (GRIFFIM, 1954; MORRISIN; ROSS, 2002; BOUCEMAL et al., 2004; CAMARGO, 2008).

Por outra parte, as nanoemulsões são uma classe de sistema disperso multifásico (RUSSE et al., 1989). As nanoemulsões são obtidas, aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar a fase dispersa em um dispersante frio ou quente, com adição de tensoativo. O posterior resfriamento permite obter a micela dispersada na fase interna (MEYAGUSKU, 2014). As nanoemulsões com o diâmetro de gotículas entre 20 e 300 nm são mais vantajosas em relação às demais nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade frente à cremeação e sedimentação, por utilizarem uma baixa concentração de tensoativos, por serem transparentes e fluidas. As nanoemulsões aumentam a molhabilidade, espalhabilidade e penetração das substâncias devido à sua baixa tensão interfacial (SOLANS, 2005).

São sistemas considerados metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e de uma estabilização estérica, quando se emprega tensoativos não iônicos e/ou polímeros na preparação (TADROS et al., 2004). Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho do glóbulo é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho é de 200 a 500 nm (CAPEK, 2004). As nanoemulsões são preparadas com uma variedade de lipídeos e são estabilizadas por tensoativos biocompatíveis, geralmente não-iônicos (MASON et al., 2006).

A estabilidade das nanoemulsões está relacionada ao emprego de tensoativos não-iônicos e/ou polímeros que conferem estabilização estérica e elétrica entre as gotículas. O uso de tensoativos reduz a possibilidade de coalescência, favorecendo o movimento browniano, e evitando assim processos de cremagem e coalescência (TADROS et al., 2004). Vários fatores podem influenciar a obtenção de partículas em

diferentes diâmetros tais como: concentração de fármaco e polímeros, quantidade de tensoativo, concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica na fase aquosa (FERREIRA, 2011).

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e a atividade tóxico-farmacológica do óleo destilado de copaíba e realizar aplicações biotecnológicas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar as características físico-químicas e químicas do óleo destilado de copaíba;
- ✓ Desenvolver uma nanoemulsão contendo o óleo destilado de copaíba e avaliar sua estabilidade físico-química preliminar;
- ✓ Avaliar a atividade anti-nociceptiva *in vivo* do óleo destilado de copaíba;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* do óleo destilado de copaíba e da nanoemulsão;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade relativa do óleo destilado de copaíba e da nanoemulsão em fibroblastos não neoplásicos de pulmão humano, e a toxicidade aguda oral em camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

Este trabalho foi executado conforme o delineamento experimental planejado como mostra a figura 2.

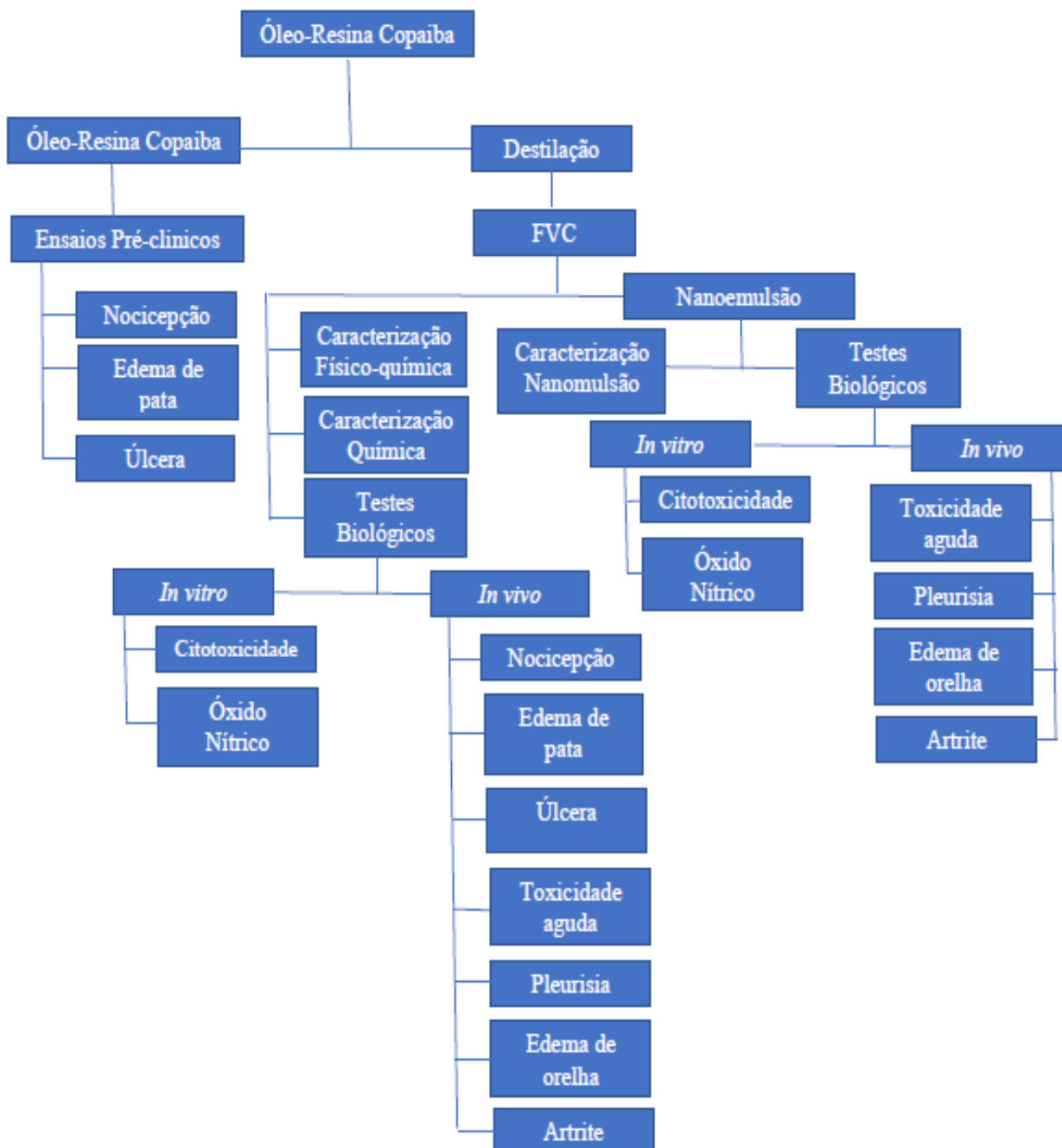


Figura 2 - Delineamento experimental do presente estudo.

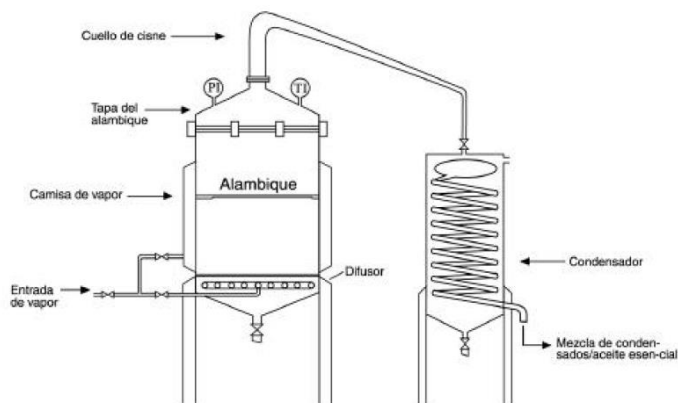


## 4.2 Material vegetal

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) utilizado neste trabalho foi coletado em 15 de abril de 2018, na comunidade indígena Dessano, Oka Diakuru, na Comunidade do Tupé de Rio Negro (3°03'10,3'' S 60°18'23,4'' W), com a permissão do Cacique da comunidade Jose Maria Fontes Vaz. O acesso foi cadastrado na plataforma SISGEN do Ministério do Meio Ambiente (Anexo 1). O óleo-resina foi submetido à destilação por arraste a vapor, para obter o óleo destilado de copaíba (ODC) a se utilizar neste trabalho. O ODC foi mantido em frascos de plástico, a temperatura ambiente, até sua utilização.

## 4.3 Obtenção do óleo destilado de copaíba (ODC) por arraste a vapor.

Para a obtenção do óleo destilado de copaíba foi utilizado um equipamento de destilação similar ao do Centro de Investigación y Asistencia em Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco - CIATEJ (BANDONI, 2003) conforme figura 3. O óleo-resina foi colocado no alambique (100 kg) e passou-se através deste o vapor gerado à temperatura de 180°C externamente por uma caldeira (figura 4). Os vapores arrastam a fração volátil (ODC) que sofre condensação por resfriamento usando água a temperatura ambiente. O processo de destilação foi realizado durante 4 horas. Logo após, o ODC, é separado da água (hidrolato) pela diferença de densidade, rendendo por volta de 75 kg de produto final. O hidrolato de copaíba foi descartado.



**Figura 3 - Equipamento piloto de extração de óleos essenciais tipo CIATEJ**  
 FONTE: BANDONI, 2003



**Figura 4 - Óleo-resina de copaíba (OBC)**

#### **4.4 Caracterização físico-química do óleo destilado de copaíba (ODC)**

##### **4.4.1. Aspecto**

Observou-se visualmente comparando a amostra em estudo com as características “macroscópicas” de uma amostra de referência (padrão) obtida no mercado, avaliando-se se ocorreram alterações do tipo separação de fases, precipitação, turvação, etc. (BRASIL, 2007).

##### **4.4.2. Cor**

A análise da cor foi realizada visualmente (colorimetria visual) comparando-se visualmente a cor da amostra com a cor do padrão armazenado em frasco da mesma

especificação. A análise foi efetuada sob condições de luz “branca” artificial (BRASIL, 2007).

#### **4.4.3. Odor**

A amostra e o padrão de referência foram acondicionados no mesmo material de embalagem e o odor foi comparado diretamente através do órgão olfatório.

#### **4.4.4 Determinação de densidade relativa em picnômetro de vidro**

Foi realizada pelo método picnométrico (BRASIL, 2007). Pesou-se o picnômetro vazio e perfeitamente limpo (M0). A seguir, encheu-se completamente com água bidestilada evitando-se a introdução de bolhas, secou-se cuidadosamente e foi pesado (M1). O picnômetro limpo e seco novamente, foi cheio com a amostra, e pesado (M2). O método foi realizado a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A densidade relativa foi calculada usando a expressão:

$$D^{25} = (M2 - M0) / M1 - M0$$

Onde:  $D^{25}$  = densidade relativa a  $25^\circ\text{C}$

M0 = massa do picnômetro vazio, em gramas

M1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas

M2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas

#### **4.4.5. Determinação de Viscosidade por viscosímetro rotativo**

Consistiu na medição do torque requerido para rodar um fuso imerso em um dado fluido. Viscosímetro rotativo: de acordo com a faixa de viscosidade da amostra, selecionou-se o fuso (spindle) adequado. A seguir, mergulhou-se o fuso diagonalmente na amostra com temperatura estabilizada, conforme especificado, isenta de bolhas, até a marca (sulco) da haste do fuso, e nivelou-se o aparelho. Verificada a ausência de bolhas

junto ao fuso, procedeu-se à leitura da viscosidade, de acordo com o procedimento operacional do aparelho (BRASIL, 2007).

#### **4.4.6 Determinação de pH**

O pH foi avaliado diretamente usando um pHmetro (Tecnopon, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4, 7 e 10 (Alphatec, Brasil). O produto por ser um óleo a determinação do pH foi realizada diretamente sobre o líquido, imergindo-se o eletrodo diretamente nele (BRASIL, 2007).

#### **4.5 Caracterização química e quantificação de $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC).**

As análises foram realizadas por CG/EM, usando um equipamento GC2010/QP2010 Plus (Shimadzu, Japão). Foi usada uma coluna capilar Rtx-5MS (30mm x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) (Restek). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi de 1 $\mu$ L, realizada em modo *splitless*. A programação da temperatura da coluna foi de 50 a 290°C, com aumento gradativo de 3°C/min. As temperaturas do injetor, da fonte de íons e linha de transferência foram de 220, 260 e 280 °C, respectivamente.

#### **4.6 Desenvolvimento da nanoemulsão e determinação do EHL requerido do óleo destilado de copaíba**

A nanoemulsão do ODC foi obtida pelo método descrito por Ostertag et al. (2012). A fase orgânica, foi composta por 5% do sistema surfactante (Tween 80®-Span 80®), e 5% do ODC, foi agitada a 400 rpm por 10 min, em agitador magnético (Ika, Suíça), à temperatura ambiente. A fase aquosa, composta por água Mili-Q

(Condutividade  $<5 \mu\Omega$ ) em quantidades suficientes para completar o 100 % (50mL), mantida à temperatura ambiente, foi vertida sobre a fase orgânica a uma velocidade aproximada de 1 ml/min, mantendo a agitação em 300 rpm. Depois da adição, a mistura foi homogeneizada durante 10 minutos em homogeneizador UltraTurrax (IKA, Suíça), a uma velocidade de 5000 rpm. A nanoemulsão foi conservada em frasco âmbar, entre 20 e 25°C, até sua caracterização.

Para a determinação do valor do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido (EHLr) pelo ODC para formar uma emulsão do tipo O/A, foram preparadas uma série de nanoemulsões, usando como tensoativos o Tween 80® (EHL 15) e Span 80® (EHL 4,3), seguindo as composições expressas na tabela 2. Após a caracterização, o valor de EHL daquela composição de surfactantes que produziu uma nanoemulsão estável, com menor tamanho de partícula foi selecionado como o EHLr do ODC (GRIFFIM, 1954).

**Tabela 2. Composição das nanoemulsões utilizadas para a determinação do EHLr do ODC.**

Nº	Água	Óleo	Tween 80®	Span 80®	EHL
1	90	5	0,33	4,67	5
2	90	5	0,79	4,21	6
3	90	5	1,26	3,74	7
4	90	5	1,75	3,25	8
5	90	5	2,20	2,80	9
6	90	5	2,66	2,34	10
7	90	5	3,13	1,87	11
8	90	5	3,60	1,40	12
9	90	5	4,07	0,93	13
10	90	5	4,53	0,47	14
11	90	5	5,00	0,00	15

#### 4.6.1 Seleção do sistema surfactante

Com a finalidade de selecionar o sistema de surfactante que rendesse a nanoemulsão com maior estabilidade e menor tamanho de partículas, foram avaliados três sistemas de surfactantes não iônicos, nas proporções necessárias para atingir o

EHLr do ODC (determinado anteriormente). Os sistemas avaliados foram Tween 20®:Span 20® (EHL 16,7 e 8,6; respectivamente); Tween 60®:Span 60® (EHL 14,9 e 4,7; respectivamente); e Tween 80®:Span 80® (EHL 15 e 4,3; respectivamente). Todos na proporção 1:1 (Surfactante: ODC). Foi selecionado como sistema surfactante ideal, aquele que rendesse a nanoemulsão estável com menor tamanho de partículas e maior potencial zeta.

#### **4.6.2 Avaliação do efeito da relação Surfactante: Óleo: Água (SOW)**

Foi avaliado o efeito de variações nas quantidades relativas do sistema surfactante (entre 7 e 15 %), e do ODC (7 a 15%) e água em quantidades suficientes para completar o 100% do volume total (50 ml), sobre as propriedades da nanoemulsão, preparada nas mesmas condições experimentais. Foi selecionada para o estudo farmacotoxicológico, aquela nanoemulsão que apresentou uma boa estabilidade, contendo a maior quantidade do ODC emulsionado, e que além disto apresentasse o menor tamanho de partícula.

#### **4.6.3 Determinação de tamanho de partícula**

O tamanho de partículas e o índice de polidispersão foram medidos pela técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS), usando um aparelho Zetasizer ZS (Malvern, UK). A nanoemulsão foi diluída apropriadamente com água Mili-Q (1:25 v:v). As medições foram feitas em triplicata e os valores reportados como a média e o desvio padrão (RODRIGUEZ et al, 2017).

#### **4.6.4 Determinação de potencial zeta**

A medição de potencial zeta foi feita de forma indireta, usando medidas de mobilidade eletroforética, num aparelho Zetasizer ZS (Malvern, UK). A nanoemulsão foi diluída apropriadamente com água Mili-Q (1:25 v:v). As medições foram feitas em triplicata e os valores reportados como a média e o desvio padrão (RODRIGUEZ et al, 2017).

#### **4.6.5 Estudo de estabilidade preliminar**

As nanoemulsões selecionadas como promissoras foram mantidas em frasco âmbar, a temperatura entre 22-25°C, durante 180 dias. O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram medidos nos dias 1, 15, 45, 90 e 180 usando as técnicas descritas acima. As medições foram feitas em triplicata e os valores reportados como a média e o desvio padrão (RODRIGUEZ *et al*, 2017). Foi selecionada para o estudo farmacológico aquela nanoemulsão que se manteve estável no tempo, que apresentou menor tamanho de partícula e menor variabilidade no índice de polidispersão.

#### **4.7 Cultivo celular**

Neste estudo foi utilizado células de fibroblasto de pulmão humano (MRC5) e macrófagos murinos (J774). As linhagens celulares utilizadas foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM) para MRC5 e meio RPMI-1640 para J774, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Gibco by Life Technologies) e 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado,

ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens, foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para o desprendimento celular das garrafas de cultura.

#### **4.8 Ensaios em cultura de células**

##### **4.8.1 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular**

A citotoxicidade da nanoemulsão do óleo destilado da *Copaífera sp.* foi avaliada em fibroblasto não neoplásico de pulmão humano (MRC-5, ATCC-USA) segundo a técnica descrita por Lafourcade et al. (2018), e em macrófagos murino da linhagem J774 (ATCC USA), segundo a técnica descrita por Nakayama et al. (1997). No ensaio com fibroblastos MCR-5 foi utilizado como controle negativo Doxorubicina 5 µg/mL, e como controle do crescimento celular o próprio meio de cultura, sem adições da amostra. Foram avaliadas concentrações de 1,65; 3,30; 6,60; 12,5; 25; 50; e 100 µg/mL, durante um tempo de 24 h. Já no ensaio com macrófago murino J744, foi utilizado como controle negativo a Staurosporin 2,5 µM, e como controle de crescimento o médio de cultura. Foram testadas as concentrações 1, 10, e 100 µg/mL da nanoemulsão. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como percentagem de viabilidade celular.

##### **4.8.2 Quantificação de Óxido Nítrico (NO·)**

A produção de óxido nítrico (NO·) foi mensurada pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage



com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo estável de coloração púrpura para assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50  $\mu$ L do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil). Para o preparo destes reagentes foram utilizadas soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% dissolvido em água destilada  $H_2O$  e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico  $H_3PO_4$  (CFQ - Química) a 5%. Anteriormente ao uso as soluções foram adicionadas na proporção 1:1 formando o reagente de Griess.

Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ) 15 $\mu$ M até 1000  $\mu$ M.

#### **4.9 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss albinos (20 a 30 g), machos, de 4 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) após liberação do pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da UFAM (Protocolo nº 039/2018, anexo 2). Os animais foram aclimatados durante 7 dias em local climatizado com temperatura de 22°C, e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. O alimento consistiu em ração e água já padronizadas pela instituição, e foi retirado para manter os animais em jejum 12 horas antes da aplicação do teste.

#### **4.9.1 Teste de toxicidade aguda oral**

O experimento foi feito seguindo a norma OECD 423 (2001). Foram usados dois grupos experimentais, de três animais cada. Um grupo controle (Grupo I) que recebeu água destilada ao longo do experimento e um grupo experimental que recebeu uma dose única de 2000 mg/kg da nanoemulsão contendo 15% do óleo destilado de *Copaifera* sp (Grupo II). Foram realizadas observações clínicas, para detectar possíveis sinais de toxicidade causadas pela nanoemulsão. Observou-se a postura, o aspecto das fezes, fechamento das pálpebras, piloereção, aspecto da pele e pelagem, salivação, aparência das mucosas e o comportamento motor. As observações foram feitas as primeiras 4 horas, e após esse tempo, cada 12 horas, até completar 14 dias, após esse período, os animais foram eutanasiados (após anestesia com Xilasina 10mg/kg i.p. e Cetamina 150mg/kg i.p.) e foram realizadas observações dos órgãos internos fígado, coração, rins, pulmões e pâncreas, para detectar possíveis sinais de toxicidade produzidas pela nanoemulsão (OECD 423, 2001).

#### **4.9.2 Atividade anti-nociceptiva do óleo destilado de copaíba (ODC)**

##### **4.9.2.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Koster e seus colaboradores (1959) com modificações. Os animais (camundongos Swiss / foram pré-tratados de acordo com os grupos, controle: H<sub>2</sub>O (0,1 mL/10 g/v.o.), indometacina (10 mg/kg/s.c.) e com OBC e ODC. Após os tratamentos 1 hora, os mesmos receberam ácido acético glacial PA (0,6% i.p.) diluído em água de injeção. Depois da administração do ácido acético, os animais foram colocados sob funis de vidro

individuais transparentes, durante 30 minutos, sendo o número de contorções abdominais quantificadas cumulativamente e caracterizadas pela contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras.

#### **4.9.2.2 Teste da formalina a 2,5%**

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Tjolsen e seus colaboradores (1992) com alterações. Os grupos de camundongos Swiss foram pré-tratados de acordo com os grupos, controle: H<sub>2</sub>O (0,1 mL/10 g/v.o.), morfina (5 mg/kg/ s.c.), indometacina (10 mg/kg/ s.c.) e com OBC e ODC. Após 1 hora, os animais foram submetidos a uma injeção de 20 µl de formalina (2,5%) na pata direita (espaço suplantar) sendo logo após a aplicação da formalina, colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho, com a finalidade de facilitar a observação.

O tempo foi registrado (segundos), em que o animal lambeu, permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada (“*licking-time*”) durante a primeira fase, atribuída de caráter neurogênica (0-5 min) e segunda fase caracterizada de inflamatória (15-30 min.).

#### **4.9.3 Atividade anti-edematogênica do óleo destilado de copaíba (ODC)**

##### **4.9.3.1 Teste do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.**

O ensaio foi realizado conforme metodologia proposta por Winter, Risley e Nuss (1962) com algumas modificações. Foram utilizados grupos de camundongos Swiss que

tiveram o volume inicial ( $V_i$ ) da pata posterior direito-esquerda medido por pletismometria. Logo em seguida, 6 grupos de animais foram pré-tratados de acordo com, controle:  $H_2O$  (0,1 mL/10 g/v.o.), indometacina (10 mg/kg/s.c.), controle para carragenina, prometazina (6 mg/kg/ v.o.), controle para dextrana e OCP (100 mg/kg/v.o) e ODC (100mg/kg/v.o.). Após 1 hora, os animais receberam carragenina/dextrana 1% (p/v) (20  $\mu$ l/pata) na pata posterior direita e controle basal salina 0,9% (20  $\mu$ l/pata) na pata esquerda. O volume da pata traseira direita e esquerda de cada animal foi registrado após 1, 2, 3, 4 h da injeção do agente flogístico (carragenina/dextrana) e controle basal.

A expressão dos resultados foi obtida pela diferença entre o volume final e o basal da pata de cada tempo, que foram calculados na fórmula:  $V.P./e = V_f - V_b$ , sendo:  $V_{e.p. d/e}$  = volume do edema da pata direito-esquerda (em  $\mu$ L),  $V_f$  = volume final de pata direita e esquerda/tempo e  $V_b$  = volume basal de pata direita e esquerda/tempo. Posteriormente foi calculado o  $\Delta$  (delta) da seguinte fórmula:

$$\Delta = V_{e.p. d} - V_{e.p.e}$$

#### 4.9.4 Teste da úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto

O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente a provável proteção gástrica do OBC e ODC em relação ao estresse, ao uso etanol. Para avaliação da úlcera gástrica induzida por etanol absoluto foi utilizada a metodologia conforme descrita por Morimoto e seus colaboradores (1991) com modificações. Após jejum de 18 h, os ratos ( $n = 6$ /grupo) foram pré-tratados por via oral (gavagem, 10mL/kg) com ODC (100% ou 400 mg/kg) ou OBC (100% ou 400 mg/kg) ou controle negativo (NaCl 0,9%). Após 1 hora, foi administrado 4 mL/kg de etanol absoluto (agente lesivo) aos animais por via oral. Decorrida 1 hora dessa administração, os ratos foram eutanasiados em câmara de

CO<sub>2</sub>, os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura. Em seguida, foram fotografados e as lesões contadas através de planimetria computadorizada com auxílio do Programa *ImageJ*<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (ALU) (mm<sup>2</sup>)

#### **4.9.5 Teste de peritonite induzido por LPS**

Camundongos foram pré-tratados com injeção intrapleural de NE15% ou dexametasona ambos na dose 5.1 µM/kg. Em seguida os animais foram desafiados com LPS (*E. coli*/O:111:B4) 250 ng/cavidade ou solução salina NaCl 0.9%. Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural lavando-se esta cavidade 2 vezes com 1 mL de PBS contendo EDTA 1 mM.

##### **4.9.5.1 Contagem total e diferencial de células**

Células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga (ThermoScientific) e o sedimento celular ressuspensão em 200 µL de BSA 3% (p/v) diluído em PBS 1x. Uma alíquota das células foi diluída 10x na solução de lise de hemácias (Solução de Turk - Imbralab) e em seguida com câmara de Neubauer foi realizada a contagem total de células. A partir dessa contagem, as células foram citocentrifugadas a 450 rpm por 5 minutos, utilizando preparações em lâminas de citospin (Shandon III) com as células ressuspensas em 100 µL de BSA, de forma que a lâmina contivesse aproximadamente 100 mil células. Após a secagem das lâminas, estas lâminas foram coradas com o método de May-Grunwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células

no microscópio óptico no aumento de 100 vezes. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células a cada contagem.

#### **4.9.6 Teste do edema de orelha induzido pela aplicação única de fenol a 10%**

Foram utilizados 6 grupos de camundongos Swiss (n = 6: 3 machos e 3 fêmeas) com pesos entre 25-35g, que tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas, topicamente, com 20 µL de fenol a 10% (v/v) (grupo1), em seguida e imediatamente após a aplicação do fenol, a orelha direita de cada camundongo recebeu a aplicação tópica de 20 µL dos agentes : OBC (grupo 2); ODC (grupo 3); nanoemulsão base (controle negativo) (grupo 4); Nanoemulsao de ODC a 15% (grupo5) e 0,005mg/sitio de dexametasona (controle positivo) (grupo 6). Após 1 hora da aplicação do fenol, os animais foram eutanasiados com dose letal da mistura de xilazina 10mg/kg i.p e cetamina 150mg/kg i.p. discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos da orelha direita e esquerda com auxílio de *punch* (perfurador de couro metálico) e após pesado em balança analítica para análise do edema (g) (GABOR, 2000; Melo et al. 2006). A quantificação do edema foi feita pela diferença dos pesos (g) entre a orelha direita e esquerda. Neste modelo, o edema na orelha dos animais alcança uma intensidade máxima 1 hora após a aplicação do fenol, assim o aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 hora após o desafio com este agente irritante (GABOR, 2000).

#### **4.9.7 Teste da artrite induzida pelo zymosan na pata de camundongo**

Foi realizado pelo teste de edema de pata que foi induzido na pata direita traseira dos camundongos por injeção subplantar de uma suspensão de zymosan (500 µg/pata)

em solução salina estéril (0.9%). Na pata esquerda foi injetada solução salina (controle negativo) (WINTER et al., 1962). As diferentes preparações, OBC; ODC, nanoemulsão base (NE); nanoemulsão de ODC a 15% (NE 15%) 600mk/kg/dia e 100 mg/kg/dia de Diclofenaco de sódio (DS-controle positivo) foram administrados trinta minutos antes da administração do zymosan nas patas traseiras dos camundongos. O grau de edema foi medido imediatamente antes e 6, 12 e 24 h depois da injeção de zymosan utilizando o paquímetro digital em milímetros (mm). Para cada animal foi avaliada cada pata individualmente, somando-se o escore de todas as patas de cada camundongo (escore máximo 16/camundongo). A diferença entre o edema das patas, determinada antes e depois da injeção do agente provocador do edema, indicou a gravidade do mesmo, e foi avaliada como a porcentagem da diferença entre o volume da pata em cada ponto de tempo e o volume da pata basal (controle negativo).

#### **4.10 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey*. A análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism*<sup>®</sup> versão 6.0, San Diego, CA, EUA. O nível de significância mínimo foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização físico-química do óleo destilado de copaíba (ODC)

O óleo destilado de copaíba apresentou-se como um óleo de aspecto líquido, fino, odor característico e de coloração amarelo claro, mas com variações (Figura 5). A densidade das amostras foi medida em um picnômetro previamente calibrado, com capacidade máxima de 1 mL à temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). Para a determinação da viscosidade, foi utilizado um viscosímetro acoplado a um banho termostático a  $50^\circ\text{C}$ . O pH foi determinado usando um pH-metro (Tecnopon, Brasil), os resultados encontrados são mostrados na Tabela 3, mostram que o óleo se apresenta como um líquido, amarelo claro, odor caraterístico, densidade 0,8942 g/mL, com viscosidade 10,7 cPS e pH entre 6,0 – 7,0.



Figura 5 - Óleo destilado de copaíba (ODC).

**Tabela 3 - Caracterização físico-química do óleo destilado de copaíba (ODC).**

PROPRIEDADE	RESULTADOS
ASPECTO	Líquido límpido transparente e oleoso
COR	Amarelo claro
ODOR	Característico do próprio óleo
DENSIDADE g/mL	0,8942
VISCOSIDADE cPS	10,7
pH	Entre 6,0 – 7,0

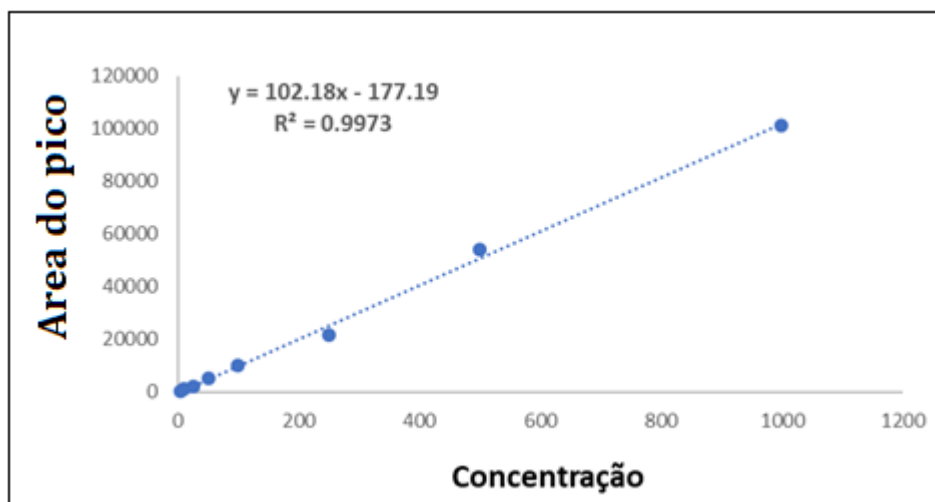


## 5.2 Caracterização química e quantificação de $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC) - Análises por CG-EM

O óleo extraído foi colocado em frasco e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Um equipamento modelo QP2010 Plus (Shimadzu) foi utilizado para realizar a identificação e quantificação. Para as separações, utilizou-se uma coluna capilar Rtx-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25) com Hélio servindo como gás carreador a um fluxo de 1,02 mL / min. As soluções injetáveis para a análise qualitativa foram preparadas dissolvendo-se cerca de 10 mg de óleo em 1 mL de diclorometano e 1  $\mu$ L da solução foi injetado com uma razão de separação de 1:50. O programa de temperatura da coluna foi de 60 a 280 ° C com aumento gradual de 3 ° C / min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram 220 ° C e 260 ° C, respectivamente. Para obter os índices de retenção, uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C7-C30) foi analisada nas mesmas condições e os cálculos foram feitos de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VANN DOOL; KRATZ, 1963). As identificações foram baseadas na comparação dos espectros adquiridos com aqueles armazenados na biblioteca da Wiley 8th edition e na comparação dos índices de retenção com os dados da literatura (ADAMS, 2007).

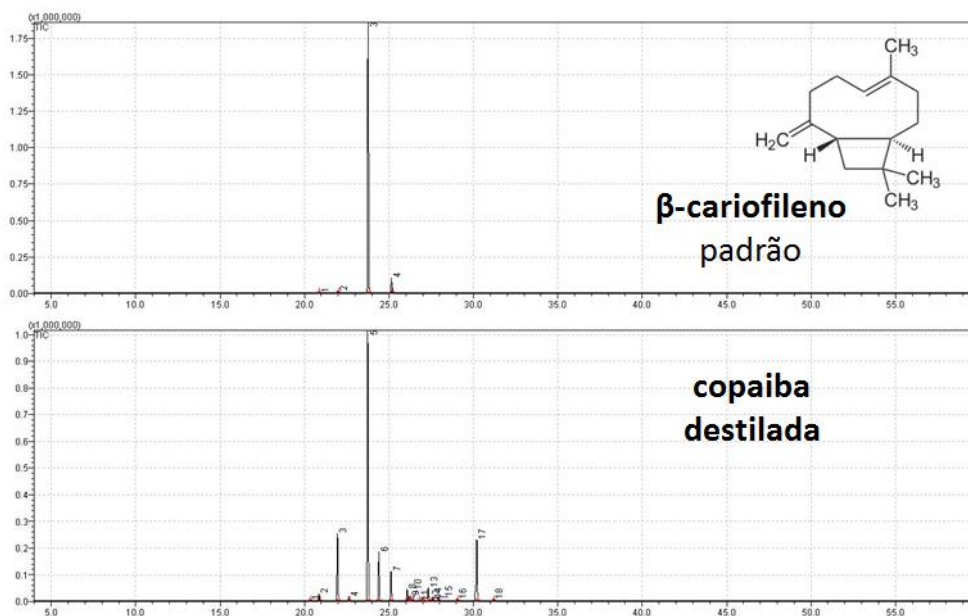
A quantidade relativa em percentual (%) da fração destilada dos constituintes do óleo de copaíba foi acessada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) utilizando um equipamento QP2010 (Shimadzu). Para quantificar o  $\beta$ -cariofileno, construiu-se uma curva de calibração com oito pontos nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu$ g / mL. Construiu-se a curva de linearidade plotando a área do pico versus concentração do padrão de  $\beta$ -cariofileno. O gráfico da figura 6 representa a linha de regressão ajustada pelo método dos mínimos quadrados

(Área do pico =  $102,18 \times \text{Concentração} - 177,19$ ) com o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,997$ ), utilizada para a quantificação do  $\beta$ -cariofileno.



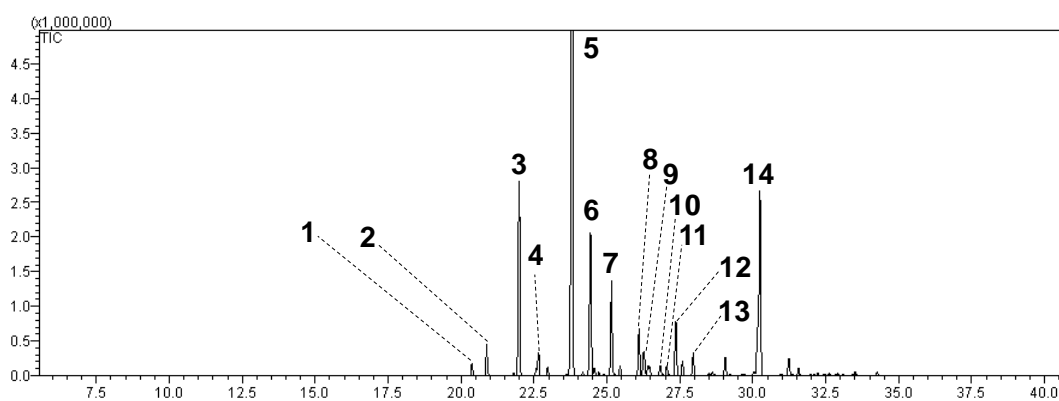
**Figura 6 - Curva de calibração para a quantificação do  $\beta$ -cariofileno do ODC.**

Uma vez que as composições dos óleos de copaíba possuem somente sesquiterpenos e diterpenos, a análise quantitativa do óleo destilado de copaíba foi investigada usando padrão comercial de  $\beta$ -cariofileno (Figura 7). O  $\beta$ -cariofileno foi selecionado por ser o composto majoritário nas diferentes amostras descritas de óleo destilado de copaíba, e provavelmente o responsável pela atividade farmacológica deste óleo.



**Figura 7 -** Cromatograma comprovando a presença do  $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba (ODC) quando comparado ao cromatograma do padrão de  $\beta$ -cariofileno.

A caracterização química do óleo destilado de copaíba identificou 14 componentes representando 100,00% das substâncias presentes conforme figura 8. As principais substâncias identificadas foram os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (40,7), óxido cariofileno (13,6%),  $\alpha$ -copaeno (10,8) e o (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno (8,02%).



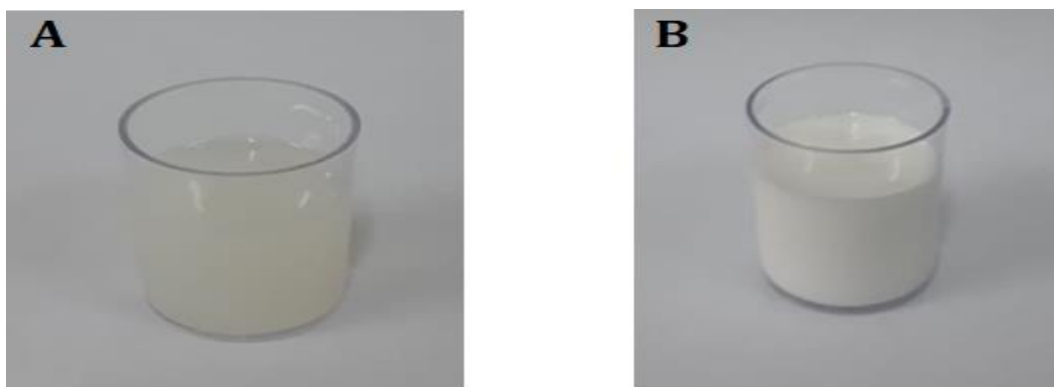
**Figura 8 -** Picos dos principais compostos no óleo destilado de copaíba (ODC) da *Copaífera* spp.:  $\beta$ -cariofileno (5); óxido cariofileno (3);  $\alpha$ -copaeno (14)  $\alpha$  e (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno (6).

**Tabela 4 - Composição química do óleo destilado de copaíba (ODC) do óleo-resina da *Copaifera* spp.**

Pico	Compostos	Tempo de Retenção	Índice de Retenção	Quantidade Relativa (%)
1	$\delta$ -Elemeno	20.3	1338	0.61
2	$\alpha$ -Cubebeno	20.8	1351	1.67
3	$\alpha$ -Copaeno	21.9	1376	10.8
4	$\beta$ -Elemeno	22.6	1390	1.26
5	$\beta$ -Cariofileno	23.7	1408	40.7
6	( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bergamoteno	24.4	1412	8.02
7	$\alpha$ -Humuleno	25.1	1438	5.29
8	$\alpha$ -Amorpheno	26.1	1484	2.51
9	Germacreno D	26.2	1481	1.52
10	Ledeno	26.8	1496	0.71
11	$\delta$ -Cadineno	27.0	1513	0.60
12	$\beta$ -Bisaboleno	27.3	1528	2.87
13	$\alpha$ -Cadineno	27.9	1538	1.31
14	Cariofileno Óxido	30.2	1583	13.6
Área total quantificada				91.5

#### 5.4 Nanoemulsões do óleo destilado de copaíba (ODC)

A fase orgânica foi composta de quantidades entre 3,0-15% de tensoativo não iônico de baixo EHL (Span80®) e quantidades entre 5-15% de óleo destilado de copaíba (EHL 11). A fase aquosa foi composta por tensoativo não-iônico de alto EHL (Tween80®), em quantidades entre 5,0-15% e água Mili-Q em quantidades suficientes para 100%. O volume final da nanoemulsão foi de 100 mL, que foi ajustado ao final do processo, utilizando água Mili-Q, figura 09. A nanoemulsão foi conservada entre 20-25 °C, em frasco âmbar.



**Figura 9 – (A) Nanoemulsão branco e (B) nanoemulsão contendo 15% do óleo destilado de copaíba (ODC)**

#### **5.4.1 Determinação do EHL requerido para o óleo destilado de copaíba (ODC)**

O valor do EHL necessário para emulsificar um óleo pode ser determinado por preparação de emulsões com emulsificantes de vários valores de EHL, e determinar qual valor de EHL produz a emulsão mais estável (BECCHER, 2001; LACHMAN et al., 2001). Esta etapa foi realizada usando os tensoativos Tween80® / Span80® em diferentes concentrações para obter valores de EHL conhecidos, e conseguir determinar o EHL requerido pelo ODC. Nanoemulsões obtidas com valores de EHL de 1,0; 2,0 e 3,0 apresentaram separação de fases após 24 horas da manipulação, enquanto as nanoemulsões obtidas com valores de EHL de 4,0 e 5,0 apresentaram leve cremagem. As emulsões que se mantiveram estáveis por mais de 24 horas foram as que possuíam EHL entre 6,0 e 15,0. Nesse caso, foi estabelecido através de experimentos realizados que o EHL ótimo para o ODC foi o EHL de valor 11,0, conforme pode ser observado na figura 10.

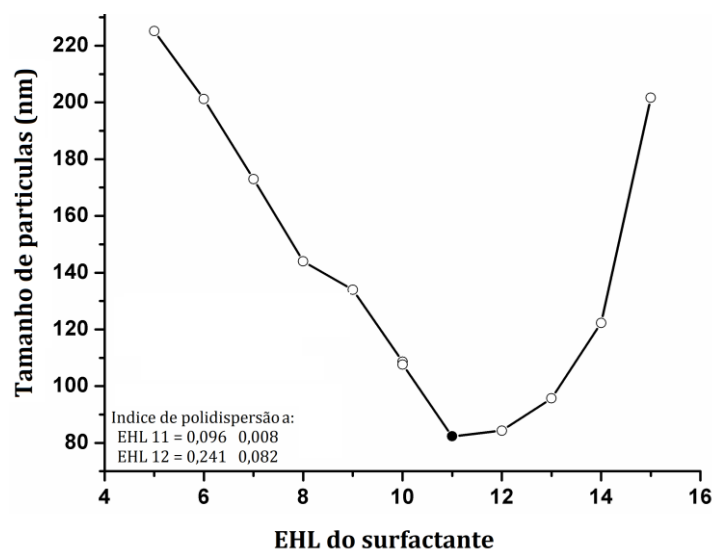


Figura 10 - Valores dos EHL da nanoemulsão relacionados ao tamanho de partículas

#### 5.4.2 Seleção do sistema surfactante

Segundo os resultados observados na tabela 5, o par de tensoativos Tween80® / Span80® proporcionou uma maior estabilidade frente aos testes preliminares de estabilidade, o que sugere que a mistura de tensoativos no valor de EHL requerido pelo ODC favorece a formação de emulsões estáveis no valor de EHL de 11,0. A análise macroscópica mostrou ausência de instabilidade física no sistema, bem como a presença de características típicas de nanoemulsões, como translucência e reflexo azulado.

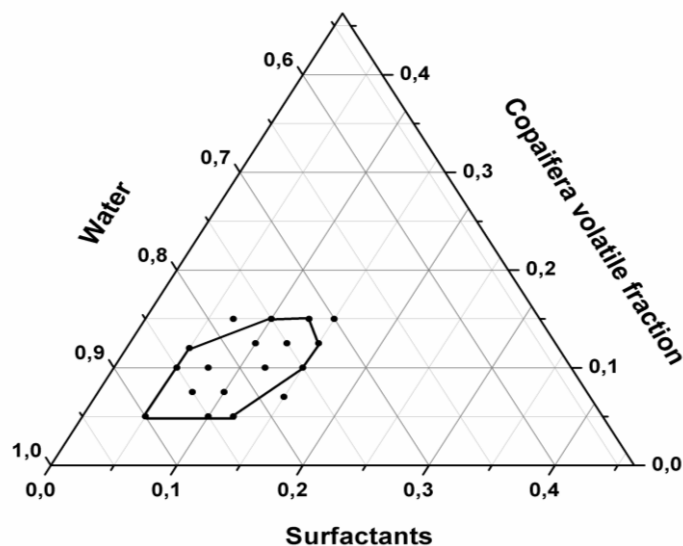
**Tabela 5- Efeito dos sistemas surfactantes sobre as principais propriedades da nanoemulsão contendo óleo destilado de copaíba (ODC).**

Surfactante tipo	Partícula Tamanho (nm)	Polidispersão índice	Zeta potencial (mV)	Condutividade (mΩ/cm)
Tween20®:Span20®	108.10 ± 1.96	0.329 ± 0,009	-35.00 ± 1.47	0.018 ± 0,004
Tween60®:Span60®	208.50 ± 3.01	0.253 ± 0.005	-33.70 ± 0.42	0.014 ± 0.006
Tween80®:Span80®	99.47 ± 0.64	0.224 ± 0.010	-37.10 ± 0.26	0.09 ± 0.000

#### 5.4.3 Relação Surfactante:Óleo:Água (SOW)

De acordo com os resultados apresentados no item 5.4.2, o par de tensoativos selecionado para a realização do diagrama ternário, a fim de encontrar a melhor

composição das emulsões a serem estudadas, foi composto de Tween80® / Span80®, no valor de EHL = 11,0. O resultado do estudo do diagrama de fases encontra-se descrito na figura 11.



**Figura 10 - Diagrama de fases do processo de avaliação do efeito das proporções de tensoativo-óleo-água nas propriedades da nanoemulsão de óleo destilado de copaíba.**

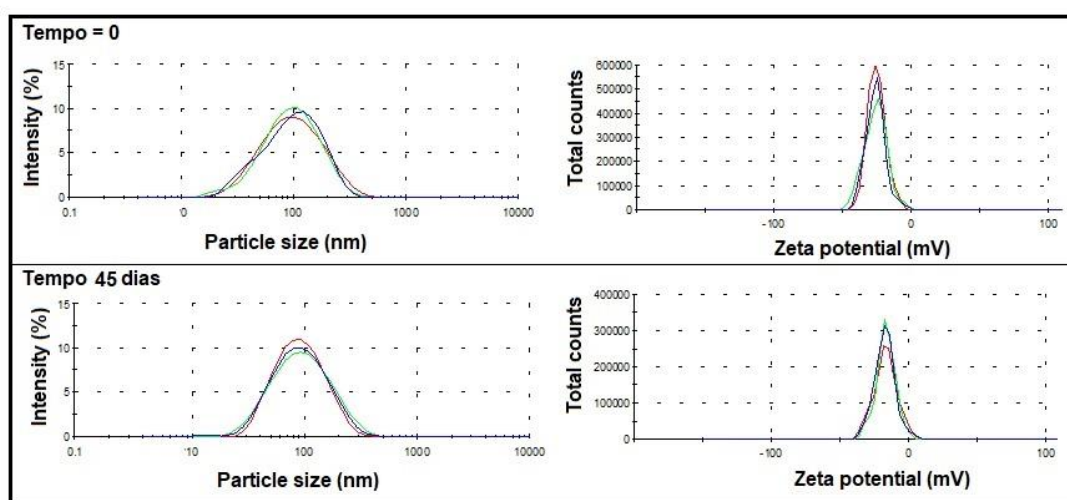
O estudo do efeito da variação da relação SOW sobre as propriedades da nanoemulsão contendo o ODC (Tabela 6) mostrou que a formulação contendo 13% do sistema surfactante, foi a mais estável quando comparada às demais, apresentando tamanhos entre 203 nm e 0,129 de índice de polidispersão (SOW 13:10:77) e para a relação SOW 13:15:72 o tamanho foi de 174 nm com 0,136 de índice de polidispersão. Assim sendo foi selecionada a nanoemulsão contendo 13% de surfactantes, 15% do ODC e 72 % de água, como a melhor formulação.

**Tabela 6 - Efeito da relação surfactante- óleo-água sobre as propriedades da nanoemulsão contendo o óleo destilado de copaíba (ODC).**

No	S:O:W (w:w:w)	Partícula tamanho (nm)	Polidispersão índice	Zeta potencial (mV)
1	10:10:80	135.90 ± 0.43	0.249 ± 0.01	-27.70 ± 0.49
2	10:15:75	184.70 ± 2.63	0.340 ± 0.04	-23.10 ± 0.43
3	13:10:77	203.50 ± 1.83	0.129 ± 0.010	-20.00 ± 0.55
4	13:15:72	174.30 ± 1.01	0.136 ± 0.010	-23.60 ± 0.17
5	15:10:75	191.20 ± 0.103	0.393 ± 0.054	-18.90 ± 0.61
6	15:15:70	196.20 ± 1.01	0.276 ± 0.009	-24.30 ± 0.20

#### 5.4.1 Estabilidade da Nanoemulsão

Foi avaliada a estabilidade da nanoemulsão contendo 15% do ODC, 13% de surfactantes (Tween80® / Span80®) e água em quantidades suficientes para 100%, durante 45 dias, antes de ser submetida aos testes de atividade biológica (Figura 12). O estudo de estabilidade desta preparação continuou por até 180 dias, mostrando um tamanho de partículas de 144 nm e um índice de polidispersão de 0,125 e mantendo-se constante o potencial zeta com valor de -24,25 mV.



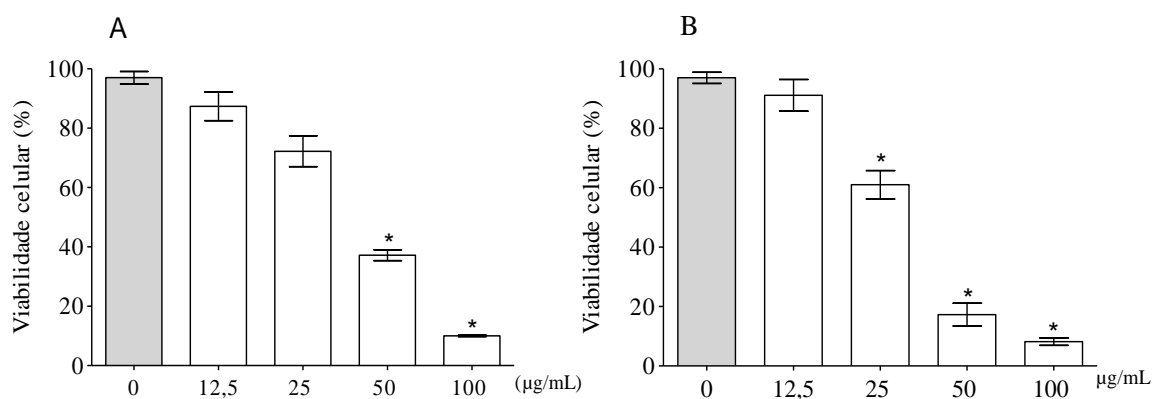
**Figura 12 - Estabilidade da nanoemulsão contendo 15% de ODC nos primeiros 45 dias de preparada. Após 45 dias: tamanho de partículas 142,2 nm, índice de polidispersão 0,126, potencial zeta -24,25 mV.**



## 5.5 Ensaios em cultura de células

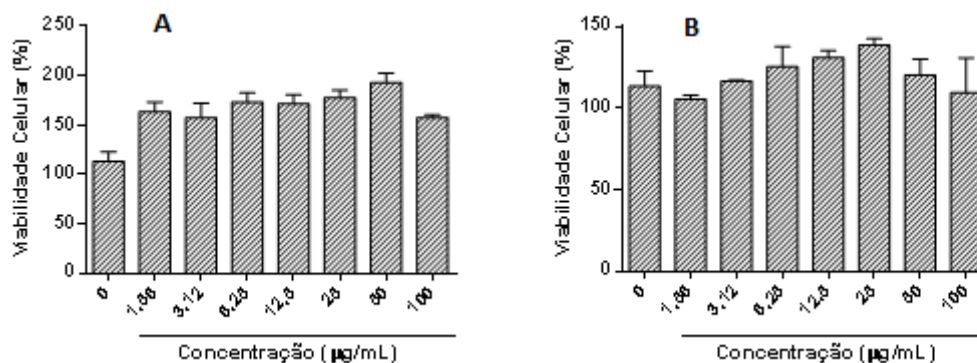
### 5.5.1 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular do óleo destilado de copaíba (ODC) e da nanoemulsão

Utilizando o método do MTT, foi avaliada a capacidade do OBC e ODC em interferir na viabilidade de fibroblastos humanos da linhagem MRC5, ou seja, se estes apresentavam potencial citotóxico. De acordo com os dados mostrados na figura 13, foi observado que nas concentrações a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$  o OBC demonstrou citotoxicidade, ao passo que o ODC apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando assim, que os óleos testados reduziram de forma significativa à viabilidade das células quando comparado com o controle (célula sem tratamento com o óleo).



**Figura 13 – (A) Efeito do óleo bruto de copaíba (OBC) e (B) óleo destilado de copaíba (ODC) sobre a viabilidade de fibroblastos humanos MRC5 avaliado pelo método do MTT.** As células foram incubadas com 0 (controle), 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de óleo por 24 h. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes, em duplicatas. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltiplas Tukey.

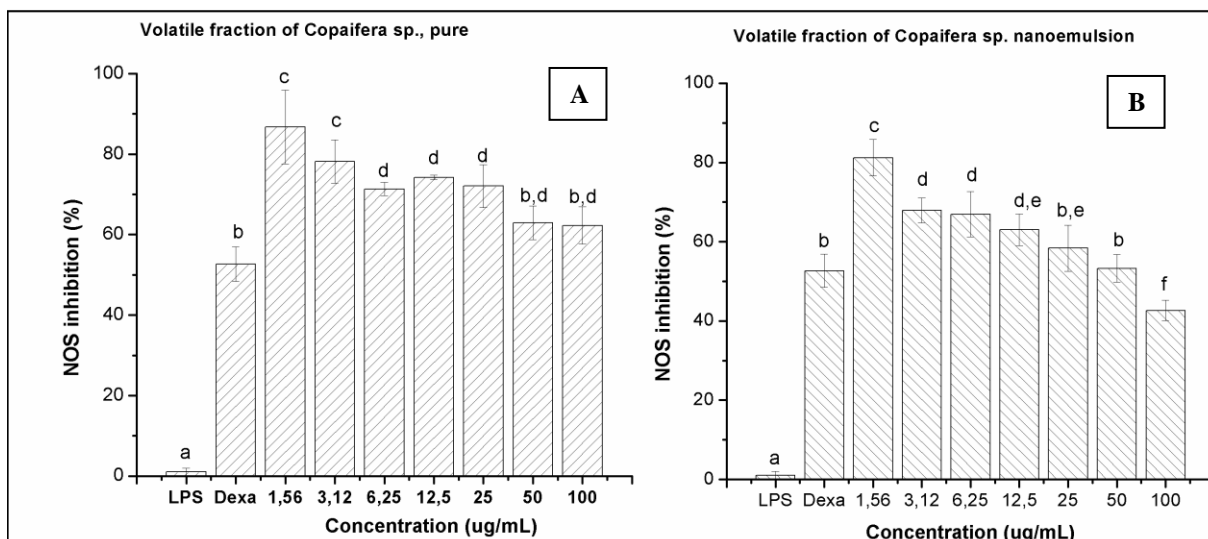
Também foram avaliadas as capacidades da nanoemulsão contendo 15% de ODC (NE 15%) nas concentrações de 1 – 100µg/mL, em interferirem na viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5) e em macrófagos J744 de camundongos em macrófagos J774 de camundongos, conforme figura 14. Os resultados de ambos os ensaios mostraram que a NE15% não produziu citotoxicidade.



**Figura 11 - (A) Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5) na presença da NE15% usando como controle positivo Doxorubicina 5µg/mL e em (B) macrófagos J744 de camundongos, usando como controle positivo Staurosporin 2,5µM, na presença da nanoemulsão contendo 15% de ODC nas concentrações de 1 – 100µg/mL. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes, em duplicatas. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltiplas Tukey.**

### 5.5.2 Efeito do óleo destilado de copaíba (ODC) e da Nanoemulsão do óleo destilado de copaíba sobre a inibição da produção de Óxido Nítrico (NO)

A figura 15 mostra que a nanoemulsão contendo 15% de ODC produziu uma melhor redução na produção de óxido nítrico em 64,80%, maior do que o fármaco padrão, dexametasona, e muito maior do que a ODC que só reduziu 12,42%.



**Figura 12 - Ensaio concentração-resposta do óleo destilado de copaíba (ODC) e da nanoemulsão contendo 15% de ODC.** A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de macrófagos murino J774A. 1 estimulado por 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS utilizando reagente de Griess. Óleo destilado de copaíba (A), Nanoemulsão de óleo destilado de copaíba a 15% (B), e padrão Dexametasona. Testes ANOVA/Dunnett's foram utilizados para análise entre os grupos. Os valores de  $*p < 0.05$ , quando comparado ao controle (com LPS). Fração volátil  $F=12,42$ ,  $p=0,000$ ; Nanoemulsão  $F=64,90$ ,  $p=0,000$

## 5.6 Toxicidade aguda oral

Na dose de 2000 mg/kg não houve a morte de nenhum animal. Após 24 h de exposição, não foram observados sinais anormais na mobilidade dos animais, nem no aspecto e cor das membranas mucosas e olhos. Os animais acessaram normalmente a água e ração, apresentando um comportamento normal. Também não foram observados sinais de toxicidade nos órgãos internos (coração, rins, fígado, pulmões e pâncreas), apresentando cor e aspecto normal, similares aos do grupo controle.

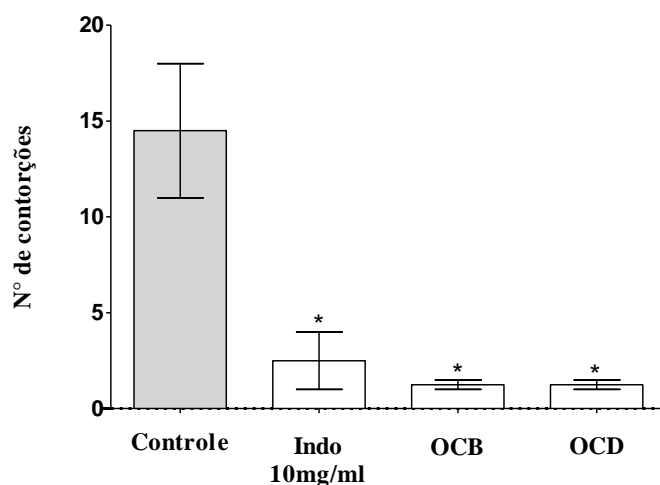
## 5.7 Atividade anti-nociceptiva

A atividade anti-nociceptiva do OBC e ODC foi investigada a partir dos modelos de contorções abdominais e teste de formalina.

### 5.7.1 Teste de contorções abdominais induzida pelo ácido acético

O teste de contorções abdominais é um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,9% (WHITTLE, 1964).

O efeito do OBC (100mg/Kg) e ODC (100mg/Kg) no ensaio de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético administrado por via oral, mostrou na figura 16 que houve redução significativa do número de contorções abdominais nos animais tratados se comparado ao grupo controle negativo. Tanto o OBC quanto o ODC mostraram uma maior redução nas contrações abdominais quando comparado ao grupo controle positivo, tratados com indometacina um anti-inflamatório não esteroideal padrão, demonstrando efeito anti-nociceptivo.

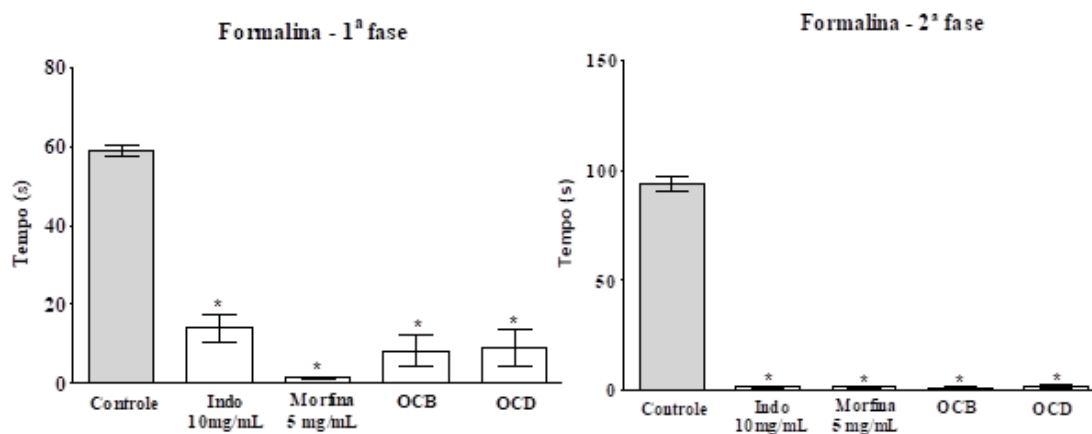


**Figura 13 - Efeito do pré-tratamento na administração oral do óleo bruto de copaíba (OBC) (100 mg/Kg) e do óleo destilado de copaíba (ODC) (100 mg/Kg) no teste de contorções abdominais induzido pelo ácido acético.** Cada barra equivale à média ± E.P.M realizado em 5 animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey.

### 5.7.2 Teste da formalina a 2,5%

O teste da formalina consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído (formalina) na pata posterior do animal, o qual induz dor intensa pela estimulação direta dos nociceptores, caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante (HESS, 2006). Esse teste, considerado de longa duração, permite a verificação de sinais presentes na fase de modulação dos impulsos nervosos, e também observar a participação de sistemas endógenos como o dos opióides (MUNGUIA, 2007).

No teste de formalina, a administração oral de OBC (100 mg/Kg) e ODC (100mg/Kg) reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata injetada com formalina na primeira fase (dor neurogênica), assim como na segunda fase (dor inflamatória) quando comparado ao controle negativo, reforçando a atividade anti-nociceptiva, conforme mostra a figura 17. A morfina (5 mg/Kg; i.p.), um analgésico opióide, foi utilizada como fármaco padrão e reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata nas duas fases desse teste conforme figura 18.



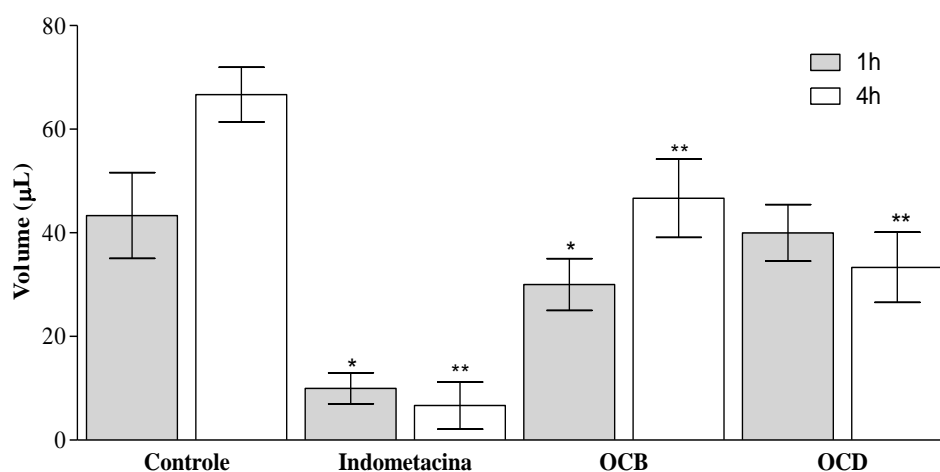
**Figura 14 - Efeito do pré-tratamento na administração oral do óleo bruto de copaíba (OBC) (100 mg/Kg) e do ODC (100 mg/Kg) no teste de lambadura de pata injetada com formalina.** Cada barra equivale à média  $\pm$  E.P.M realizado em 6 animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (Análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey.

## **5.8 Atividade anti-edematogênica**

### **5.8.1 Efeito do edema de pata induzido por carragenina**

Com o intuito de avaliar o efeito anti-edematogênico do OBC e ODC foi utilizado o modelo edema de pata induzido por carragenina. Esse tipo de teste é utilizado para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial anti-inflamatório (MORRIS, 2003; WILLOUGHBY, 2003). A carragenina, polissacarídeo sulfatado, é um agente flogístico indutor de um processo inflamatório agudo, que se desenvolve rapidamente devido à ação de vários mediadores pró-inflamatórios, associado à hiperalgesia, e se caracteriza por edema, exacerbada sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos (MORRIS, 2003; FERREIRA et al., 2004).

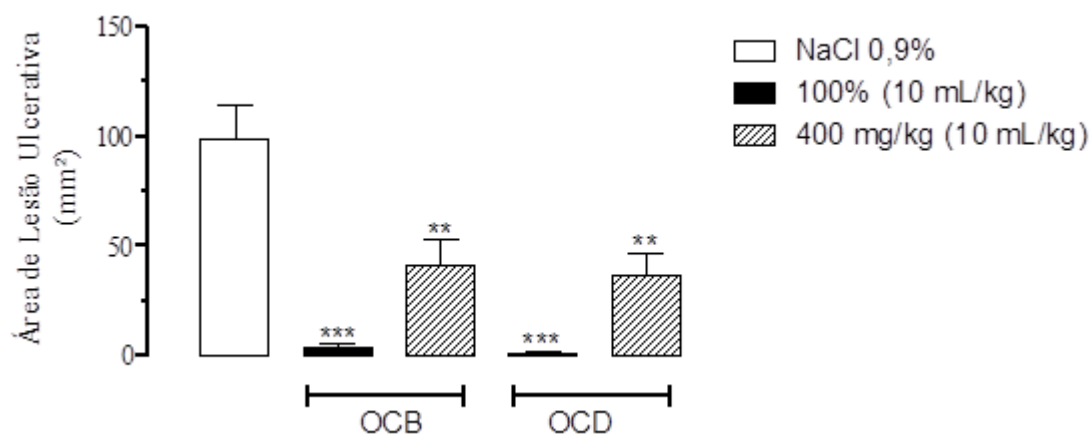
O efeito anti-inflamatório do OBC e ODC foi avaliado pelo método do edema de pata induzido por carragenina conforme mostrado na figura 18. O aumento de volume da pata dos animais nos tempos de 1 h, 2 h e 4 horas resultou da agressão causada pelo agente flogístico (carragenina a 1%) na pata desses animais. O tratamento por via oral do OBC reduziu significativamente o edema de pata na primeira e na quarta hora após o tratamento quando comparado ao grupo controle, enquanto que o ODC apresentou efeito de redução do edema apenas após a quarta hora de tratamento quando comparado ao controle. Esse resultado foi significativo quando comparado ao grupo tratado com indometacina.



**Figura 15 - Efeito do pré-tratamento na administração oral do OBC (100 mg/Kg) e do óleo destilado de copaíba (ODC) (100 mg/Kg) no teste o edema de pata induzido pela carragenina.** Cada barra equivale à média  $\pm$  E.P.M da diferença entre pata esquerda e direita de 5 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo após 1 hora de tratamento e \*\* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo após 4 horas de tratamento por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey.

### 5.9 Avaliação da úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto

Podem-se observar pelos dados da figura 19 referentes aos efeitos do OBC e ODC sobre as lesões gástricas induzidas por estresse, que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Nas doses de OBC 100% (10 mL/kg) e ODC 100% (10 mL/kg) apresentaram os maiores valores de média, enquanto que, com referência aos efeitos do OBC na dose 400 mg/kg e do ODC 400 mg/kg sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos, foi possível verificar que embora havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, os mesmos apresentaram valores menores do que na forma de óleo bruto.

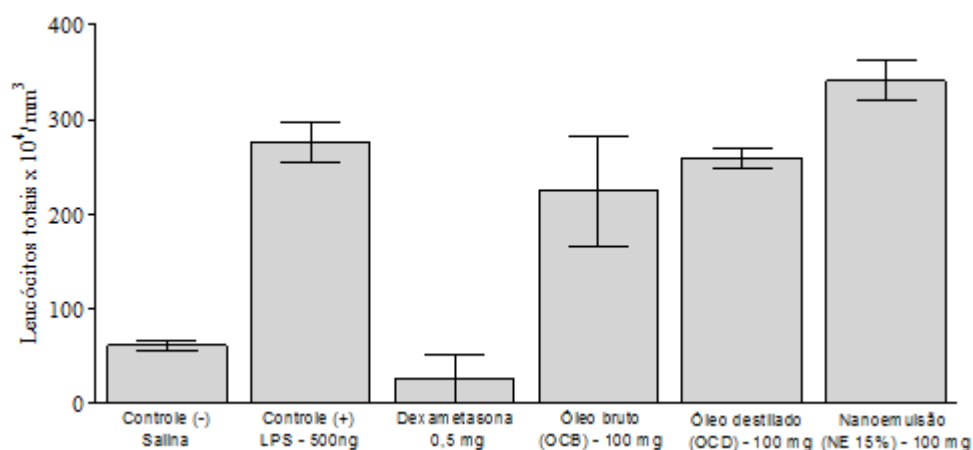


**Figura 16 - Efeito do pré-tratamento da administração oral do óleo bruto de copaíba (OBC) e do óleo destilado de copaíba (ODC) em úlceras induzidas por etanol em ratos.** Cada barra equivale à média  $\pm$  E.P.M realizado em 6 animais. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey

### 5.10 Teste de peritonite induzido por LPS

As preparações OBC, ODC e a nanoemulsão contendo 15% de ODC não reduziram a migração de leucócitos para o peritônio provocado pelo LPS, enquanto que a dexametasona (0,5 mg/kg) inibiu a migração dos leucócitos quando comparado ao grupo de veículo negativo, conforme pode ser visto na figura 20.





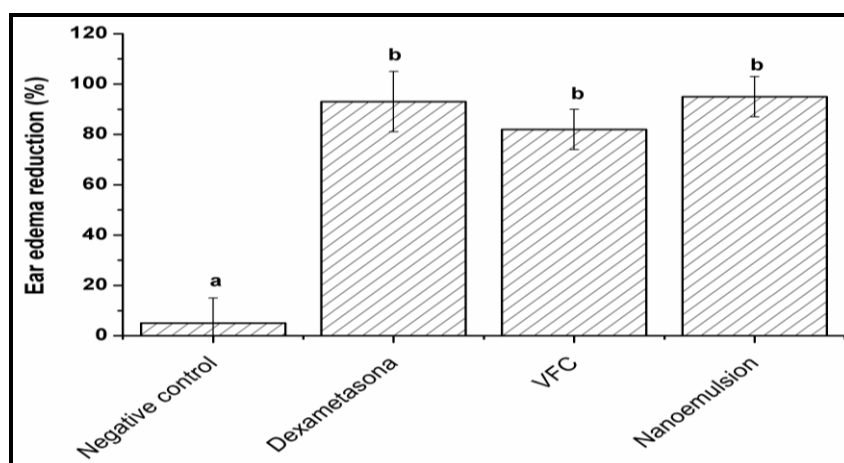
**Figura 20 - Efeito das preparações contendo óleo bruto de copaíba (OBC), óleo destilado de copaíba (ODC) e Nanoemulsão do óleo destilado de copaíba (NE 15%) sobre a peritonite induzida pelo LPS em camundongos.** Cada barra equivale à média  $\pm$  E.P.M realizado em 6 animais.  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey

### 5.11 Teste sobre edema de orelha induzido pelo fenol em camundongos.

Neste estudo, foi avaliada a atividade anti-edematogênica do ODC e da nanoemulsão contendo 15% de ODC aplicados por via tópica utilizando o modelo *in vivo* de edema de orelha. O modelo de edema de orelha é amplamente útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de compostos bioativos em inflamações cutâneas (BLAZSO; GABOR, 1995; GABOR, 2000), uma vez que é uma metodologia bastante simples, de resultados rápidos, reprodutibilidade e baixas possibilidades de erros quando bem aplicado, além de ser um modelo que minimiza uso de animais e de substâncias e que permite verificar a atividade de constituintes no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GABOR, 2000). Os agentes flogísticos ativam quimicamente um processo inflamatório, diferentes substâncias com esse potencial podem ativar vias diversas da cascata inflamatória, desencadeando os sinais característicos como edema, aumento da

permeabilidade, vasodilatação, eritema. Por ativar vias diversas, a aplicação de diferentes agentes flogísticos (óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina, fenol, histamina) é justificada por seus mecanismos específicos, já conhecidos, na indução do processo inflamatório, cujos resultados obtidos podem sugerir um provável mecanismo da ação anti-inflamatória, a absorção e a possível ação local da substância em estudo devido a sua aplicação direta no foco inflamatório (BLAZSO; GABOR, 1995; GABOR, 2000; VANE, 2000; SURH, 2005).

Os resultados apresentados na figura 21 demonstraram claramente o efeito anti-inflamatório tópico do ODC, da nanoemulsão contendo 15% de ODC (NE15%) e a dexametasona no modelo de edema de orelha induzido pelo fenol, a NE 15% se mostrou ser o anti-inflamatório mais potente de todas as preparações, inclusive ao da dexametasona, não só pelo efeito mais também pela pequena quantidade de óleo destilado de copaíba contido na nanoemulsão.

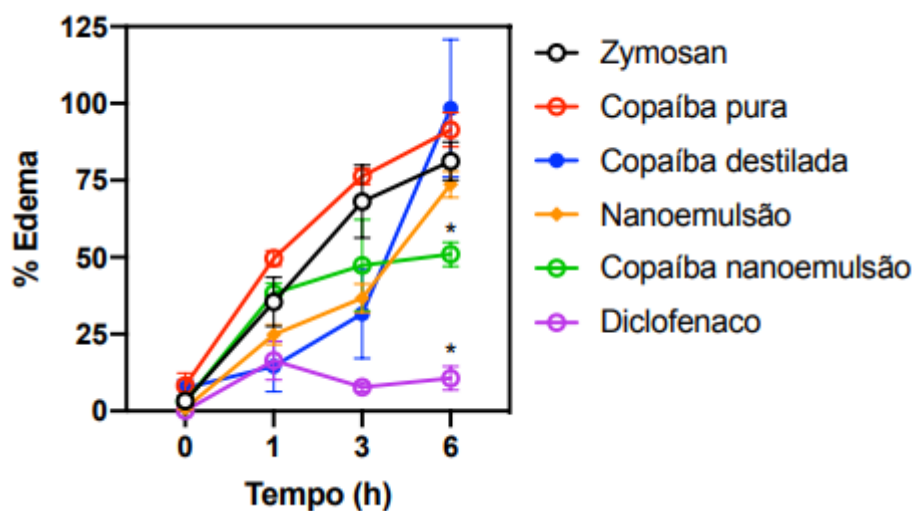


**Figura 17 - Efeito da Nanoemulsão do óleo destilado de copaíba (NE 15%) sobre o edema de orelha induzido por fenol a 10%.** Os animais receberam topicamente 20 $\mu$ L de Fenol a 10% e em seguida foi aplicado 20 $\mu$ L de ODC – óleo destilado de copaíba bruto; DEX - Dexametasona 0,005/sítio; O efeito anti-edematogênico das substâncias foi edema calculado a partir da diferença entre as massas de discos de 6 mm de diâmetro da orelha direita e esquerdas obtidas depois de 1 hora de aplicação do fenol. Cada grupo representa a média de 6 animais. Análise estatística: Teste de Tukey HSD

### **5.12 Efeito da Nanoemulsão de óleo destilado de copaíba sobre a artrite induzida pelo zymosan**

Os modelos experimentais para novas abordagens terapêuticas para a artrite reumatoide (AR) são comumente utilizados para fornecerem conhecimento sobre os mecanismos da doença e estudo de novos agentes terapêuticos (WILSON et al., 2006; ROCHA et al., 2008; BOLON et al., 2011). A AR pode ser induzida em animais por vários agentes arritmogênicos, tais como o zymosan (zy), adjuvante (adjuvante incompleto de Freund - IFA e adjuvante completo de Freund - CFA), colágeno bovino tipo II, antígeno e imunocomplexos. A artrite induzida por zymosan é de fácil indução, início bem definido, baixo custo operacional com boa reprodutibilidade e confiabilidade da lesão em 6 horas (fase aguda), podendo ser usado em protocolos experimentais por ter parâmetros imunológicos e de atividade capazes de serem rapidamente medidos (OLIVER & BRAHN, 1996; MENEZES, 2013).

A figura 22 mostra que após o pré-tratamento com preparações OBC; ODC: NE, NE 15% e DS antes da indução da artrite, verificaram-se depois de 6 horas as seguintes diferenças conforme a cinética do edema na pata dos animais que a NE 15% apresentou melhor redução do que a NE base, ainda que a NE 15% reduziu a artrite melhor do que o óleo de copaíba puro.



**Figura 18 - Efeito da NE15% após o pré-tratamento com preparações OBC; ODC: NE, NE 15% e DS (Diclofenaco sódico) antes da indução da artrite pelo zymosan em edema de pata em camundongos.** Após 6 horas a NE 15% apresentou melhor redução do edema de pata que a NE base ( $p=0.003$ ), ainda que a NE 15% reduziu a artrite melhor do que o óleo de copaíba puro ( $p=0.045$ )

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, otimizou-se a extração da fração volátil do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) pelo método de arraste a vapor. O óleo destilado de copaíba apresentou-se com aspecto líquido, fino, odor característico a madeira e coloração amarelo claro. Apresentou uma densidade relativa de 0,894, viscosidade de 10,7 cPS e pH na faixa entre 6-7.

O óleo destilado de copaíba é rico em sesquiterpenos que foram identificados por CG/EM e quantificados por cromatografia gasosa. Os principais picos observados no cromatogramas correspondem ao  $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -Car) (40,70%), óxido cariofileno (13,6%) e  $\alpha$ -copaeno (10,8%). Resultados semelhantes foram observados na composição do óleo-resina do gênero *Copaifera* L. (Leguminosae), porém, com menor intensidade e com predomínio de  $\beta$ -cariofileno (36,0%), seguido de  $\alpha$ -copaeno (18,8%),  $\beta$ -bisaboleno (8,5%) e  $\alpha$ -trans-bergamoteno (7,0%) (KOBAYASHI et al., 2011). No óleo essencial da *Copaifera langsdorffii* Desf, o composto maioritário foi o  $\beta$ -bisaboleno (23,6%),  $\beta$ -cariofileno (21,7%) e  $\alpha$ -bergamoteno (20,5%) (XAVIER-JUNIOR et al., 2017), onde ambos os resultados apresentaram um teor de  $\beta$ -Car predominantes, o que pode tornar a fração volátil um insumo ser utilizado na terapêutica, haja vista que o OBC apresenta uma grande variabilidade no teor dessa substância.

Podemos observar nas composições químicas dos óleos-resina de copaíba de três espécies diferentes, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke que, embora similares, possuem composição variada no teor de  $\beta$ -Cariofileno (57,5, 19,7 e 40,9%, respectivamente), e o principal composto nestes óleo-resinas foram o  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -bergamoteno, todos em quantidades diferentes (VEIGA JUNIOR et al., 2007; LEANDRO et al., 2012). Assim, a grande

variabilidade na composição química torna difícil sua padronização para utilização como matéria-prima na indústria farmacêutica (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004; BIAVATTI et al., 2006; HERRERO-JÁREGUI et al., 2011).

Diferentemente do OBC, o ODC em todas as espécies testadas mostrou mais homogeneidade na composição química, independente da espécie utilizada (VEIGA JUNIOR et al., 2007; SOUSA et al., 2011) sendo o  $\beta$ -Car o constituinte majoritário. Isso faz com que o ODC seja uma maneira mais viável para padronizar esse produto para sua utilização na indústria farmacêutica e cosmética (SOUSA et al., 2011).

Neste trabalho se propôs uma nanoemulsão contendo ODC. A fase orgânica da nanoemulsão foi composta de quantidades entre 3,0-15% de tensoativo não iônico de baixo EHL (Span80®) e quantidades entre 3-15% de óleo destilado de copaíba (EHL 11). A fase aquosa foi composta por tensoativo não iônico de alto EHL (Tween80®), em quantidades entre 3,0-15% e água Mili-Q em quantidade suficiente para 100%. O volume final da nanoemulsão foi de 100 mL, que foi ajustado ao final do processo, utilizando água Mili-Q. Para a preparação da emulsão estável do tipo O/A, deve-se considerar o EHL e a solubilidade da cadeia lipídica do emulsificante na fase oleosa (LACHMAN et al., 2001). O valor do EHL necessário para emulsificar um óleo pode ser determinado por preparação de emulsões com emulsificantes de vários valores de EHL, e determinar qual valor de EHL produz a emulsão mais estável (BECCHER, 2001; LACHMAN et al., 2001) e conseqüentemente tem grande importância na determinação das propriedades da dispersão (ESQUENA; SOLANS, 2001; ZHANG; QUE, 2008).

Para a determinação do EHL requerido pelo ODC foram realizadas nanoemulsões com Tween80® / Span80® usando diferentes proporções. As emulsões

obtidas que não foram estáveis após 24 horas da manipulação foram as preparadas com valores de EHL 1,0; 2,0 e 3,0. As nanoemulsões feitas com valores de EHL de 4,0 e 5,0 apresentaram leve cremeação. No entanto, as nanoemulsões feitas com valores de EHL entre 6,0 a 15,0 se mantiveram estáveis por mais de 24. Nesse caso, foi estabelecido através de experimentos realizados que o EHL ótimo para o ODC foi o EHL de valor 11,0.

De acordo com CHANAMAI et al. (2002), a estabilidade de uma nanoemulsão frente à cremeação depende da composição do óleo, pois a densidade da gotícula depende do tipo e da concentração de moléculas apolares presentes na fase interna. Além disso, a taxa de transporte destas moléculas apolares através do filme interfacial para fase aquosa depende de sua solubilidade na água e, em função disso, o crescimento das gotículas por Oswald *ripening* também será dependente da composição do óleo.

Na seleção do sistema surfactante, dos três pares de sistemas de tensoativos testados, os resultados mostraram que o par de tensoativos Tween80® / Span80® proporcionou uma nanoemulsão com maior estabilidade, comprovando-se nos testes preliminares de estabilidade. Isso sugeriu que a mistura de tensoativos com valor de EHL 11, favorece a formação de emulsões estáveis contendo ODC. A análise macroscópica mostrou a boa estabilidade física do sistema, bem características típicas de nanoemulsões, como translucência e reflexo azulado.

Com a finalidade de encontrar a melhor composição das nanoemulsões a serem estudadas, foi avaliado o efeito da relação Surfactante-Óleo-Água (SOW), sobre as propriedades da nanoemulsão. Usou-se o par de tensoativos Tween80® / Span80®, no valor de EHL = 11,0, para a construção do diagrama pseudoternário. O estudo mostrou que as formulações contendo 13% do sistema surfactante, possuíam as melhores propriedades e estabilidade físico-química, quando comparada com as demais

formulações. A formulação (SOW 13:10:77) apresentou um tamanho de gota de 203 nm e 0,129 de índice de polidispersão, e a formulação SOW 13:15:72 mostrou tamanho de 174 nm com 0,136 de índice de polidispersão. Assim sendo foi selecionada a nanoemulsão contendo 13% de surfactantes, 15 % do ODC e 72 % de água, como a melhor nanoemulsão.

Segundo LACHMAN et al. (2001), emulsões O/A mais estáveis, são formadas com uma combinação de tensoativos lipofílico e hidrofílico, ainda que seja possível obter formulações estáveis utilizando um único emulsificante. É aconselhável a mistura de um emulsificante de baixo valor EHL (lipofílico) com outro de alto valor de EHL (hidrofílico) promovendo a formação de uma interface coesa, visto que cada tipo de emulsificante se adsorverá a fase correspondente (PINHO; STORPIRTS, 1998; PRISTA et al., 1992). Estudos realizados por GULLAPALI; SHEETH (1999) demonstraram que a similaridade estrutural entre os emulsionantes e a fase dispersa é mais relevante que o valor de EHL para a obtenção de emulsões estáveis.

Foi avaliada a estabilidade da nanoemulsão contendo 15% do ODC, 13% de surfactantes (Tween80® / Span80®) e água em quantidade suficiente para 100%, durante 45 dias, antes de ser submetida aos testes de atividade biológica. O estudo de estabilidade desta preparação continuou por até 180 dias, mostrando um tamanho de partículas de 144 nm e um índice de polidispersão de 0,125 e mantendo-se constante o potencial zeta com valor de -24,25mV. Mostrando sua estabilidade por até 180 dias.

A atividade anti-inflamatória de nanoemulsões contendo ODC a 10% e 15% (NE 10% e NE 15% respectivamente) foi também avaliada *in vitro*. Assim, essas nanoemulsões foram testadas quanto à capacidade de induzir toxicidade em células de macrófago murino e fibroblastos de pulmão humano. Nos experimentos, as



nanoemulsões não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas nas células normais de pulmão humano MRC5 e também não apresentaram qualquer influência na viabilidade dos fibroblastos. Nesta análise podemos destacar que não houve diferença entre os tipos de linhagem celular e não houve ação tóxica dessas nanoemulsões em ambas as linhagens celulares MRC5 e J774A.1. Este resultado foi contrário ao observado na pré-incubação de monócitos humanos THP-1 estimulados por LPS com concentrações crescentes da fração purificada de óleo-resina (OR-PF), contendo diterpenos e sesquiterpenos. A incubação reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), fornecendo fortes evidências de que sua atividade anti-inflamatória está relacionada à inibição da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, da secreção de citocinas pró-inflamatórias. (GELMINI et al., 2013). Este resultado diferente do ODC testado se deve provavelmente a associação ácidos diterpênicos, diterpenos e sesquiterpenos presente na OR-PF.

Neste estudo foi observado o efeito das nanoemulsões contendo ODC 10% e NE15%, óleo destilado de copaíba puro e óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a inibição da produção de NO $\bullet$  em macrófagos murino J774A.1 ativados por LPS. Em geral, pode-se observar que todos os compostos obtiveram a capacidade de inibir a produção de NO $\bullet$  em macrófago murino nas concentrações testadas, porém o mecanismo não foi totalmente esclarecido, tendo em vista que não foi possível realizar a análise da expressão de mRNA da proteína iNOS por Western blot e/ou pela técnica de reação em cadeia de polimerase na linhagem de macrófago murino ou outros testes complementares. A iNOS quando expressa libera maiores concentrações de NO $\bullet$ . O presente trabalho torna-se pioneiro neste estudo de inibição da produção de óxido nítrico NO $\bullet$  direcionado as nanoemulsões contendo ODC. Contudo, a continuidade dos

ensaios se faz necessário para a elucidação do mecanismo de inibição de iNOS e a sucessiva inibição de NO<sup>•</sup>.

Resultados semelhantes foram observados na avaliação dos efeitos farmacológicos de três oleo-resinas de espécies diferentes, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke, medindo a produção de NO<sup>•</sup> por macrófagos murinos. O óleo de copaíba de *Copaifera multijuga* Hayne (100 mg / kg) foi o mais potente, inibindo a produção de NO<sup>•</sup>. As oleorresinas de *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke também inibiram a produção de NO<sup>•</sup>, mas com menor intensidade. (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Os resultados observados na redução da ativação de macrófagos estimulados por LPS a partir da nanoemulsão contendo ODC foram importantes para o delineamento dos experimentos *in vivo* os quais investigaram alguns mecanismos da possível atividade anti-inflamatória dessa formulação.

Antes do início dos ensaios *in vivo*, o ODC isoladamente e NE15% foram avaliadas quando a toxicidade aguda em camundongos. O presente estudo foi o primeiro que avaliou a toxicidade letal aguda do ODC e da NE 15%, onde os camundongos Swiss machos (n = 3/grupo), em jejum prévio de 12 horas (água disponível), foram tratadas com doses de 2000 mg/kg peso corpóreo de ODC, NE 15% e NE base (v.o.), com acesso livre apenas de água, com ração permitida 3 h após a administração. A seguir foram acomodados em gaiolas e observados por um período de 4 horas para avaliação de possíveis alterações comportamentais ou morte. Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pelos, estresse, salivação, olhos e

comportamento (Moser et al., 1997 a, b, c). Os animais foram avaliados nos tempos 24, 48 e 72 horas, seguidos de observação por um período total de 14 dias com o intuito de verificar a possível ocorrência de óbito e alteração no peso corporal (OECD, 2008). Durante todo o período de observação foram disponibilizados ração e água *ad libitum*.

A dose de 2000 mg/Kg peso corpóreo é recomendada pelo protocolo (OECD)-423/2001, onde estabelece que quando há trabalhos científicos que nos dão informação quanto a capacidade de mortalidade de uma determinada substância seja improvável no mais alto nível da dose inicial, então se utilizou a dose de 2000 mg/Kg. Nenhum dos três animais de cada grupo expostos apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 h após a exposição e durante o período do estudo. Desta forma, repetiu-se o teste nesta mesma dose com outros três animais, o que confirmou o resultado anterior. As mudanças comportamentais, morbidade e mortalidade, as quais poderiam ser observadas nos animais após receber o tratamento, não foram observadas durante 4 horas ininterruptas, nas 24 horas sucessivas e nem durante os 14 dias de experimentação em nenhum dos 3 animais de cada grupo. Os animais também não apresentaram alterações nos pelos, pele, olhos e mucosas, sinais de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, coma, dor e sofrimento, esses resultados são semelhantes aos reportados por Ribeiro et al. (2007), que não verificaram quaisquer alterações no padrão de comportamento de roedores expostos ao óleo-resina e fração volátil de copaíba em doses crescentes de 50 a 800 mg/kg *p.o.* Entretanto, Brito et al. (1999) observaram que a administração oral de 0,63 mL/kg *p.o.* do óleo-resina de copaíba durante quatorze dias foi capaz de promover irritabilidade nos ratos testados.

Ao final dos 14 dias de acompanhamento, nenhuma morte foi registrada, não havendo também diferença no ganho de peso corporal em relação ao grupo controle. No

décimo quarto dia, os animais foram sacrificados após serem anestesiados com xilasina 10mg/kg i.p. e Cetamina 150mg/kg i.p. Durante a necropsia, os órgãos da cavidade corpórea (pulmões, traquéia, coração, estômago, fígado, baço, rins, bexiga, intestino e timo), vísceras, glândulas, vasos, canais e diafragma foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência, não havendo qualquer alteração em relação ao grupo controle. Os mesmos resultados foram obtidos por Brito et al. (2001) onde nenhuma alteração foi encontrada nos animais testados no estudo da administração do óleo-resina de copaíba. Com os resultados obtidos, observamos que a toxicidade oral aguda do ODC e da NE15% foi maior que 2000 mg/kg *v.o.* e classificado como categoria 5, ou seja, com baixa toxicidade aguda e com DL-50 acima de 2000 mg/Kg. Estes resultados apresentam uma excelente tolerância dando suporte para futuros estudos de longa duração devido à baixa toxicidade na dose avaliada.

Visando avaliar também o possível efeito anti-nociceptivo, o ODC foi avaliado *in vivo* por dois modelos: teste de contorções abdominais e da formalina. O modelo de edema de pata para atividade anti-inflamatória e de úlcera gástrica também foram realizados *in vivo*. Nos estudos os resultados do ODC foram comparados com o OBC também testado. Tanto o ODC quanto o OBC mostraram uma redução significativa do número de contorções abdominais induzida pelo ácido acético, quando comparado ao grupo controle negativo e os dados obtidos sugerem que a ação anti-nociceptiva dos óleos de copaíba possa estar associada à inibição de citocinas pró-inflamatórias, bem como mediadores inflamatórios, de modo a contribuir para o alívio de dores leves a moderadas. Por outro lado, também se verificou que o ODC e o OBC produziram uma redução dessas contorções nos animais de modo superior ao do grupo controle positivo,

tratados com indometacina um reconhecido anti-inflamatório não esteroidal padrão, que possui potente atividade analgésica e anti-inflamatória, inibindo a transmissão nociceptiva, além da prevenção do edema e da inflamação (STEAGALL et al., 2009). Esses resultados corroboram com o estudo comparativo da atividade anti-nociceptiva de dois óleos da Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) administrados por via oral utilizando a técnica de contorção induzidas por ácido acético, cujos resultados demonstraram que os óleos de copaíba nas doses variando de 30 a 150 mg/kg foram suficientes para desenvolver significativamente o efeito anti-nociceptivo periférico e central de ambos os óleos, esta última atividade foi inibida pela naloxona (GOMES et al., 2007). Nossos dados demonstraram que as atividades anti-nociceptivas do ODC e OBC podem estar parcialmente relacionadas à inibição da síntese de prostaglandinas ou à liberação de outros mediadores endógenos.

No presente estudo, demonstramos que o tempo de lambida da pata injetada com formalina 1% foi atenuado significativamente para o ODC e OBC nas doses (100 mg/kg) testadas, tanto na fase neurogênica (0-5 min.) quanto na fase inflamatória (15-30 min.) do teste. De acordo com Hunskaar e Hole (1987), o efeito anti-nociceptivo do paracetamol, droga de referência, na 1ª fase do teste da formalina deve-se à sua ação sobre a COX-3 no sistema nervoso central que conseqüentemente leva à inibição da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) (FELDBERG; GUPTA, 1973) além de modular o sistema opioide (MAREK; AGHAJANIAN, 1998; RUGGIERI et al., 2008), canabinóide (HÖGESTÄTT, et al. 2005) e serotoninérgico (PELLISSIER et al., 1996; PINI et al., 1996). Por outro lado, o efeito periférico do paracetamol durante a 2ª fase do teste da formalina pode envolver inibição, mesmo que discreta, da COX-1 e 2 (AMINOSHARIAE; KHAN, 2015). Estes dados corroboram com o estudo comparativo

da atividade anti-nociceptiva de dois óleos da Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) administrados por via oral utilizando a técnica de contorção abdominal induzida ácido acético e pela formalina, cujos resultados demonstraram que os óleos de copaíba não desenvolveram efeitos tóxicos e que doses variando de 30 a 150 mg / kg foram suficientes para desenvolver significativamente o efeito anti-nociceptivo periférico. Portanto, os resultados indicam claramente que os óleos empregados no estudo produzem efeito anti-nociceptivo que pode envolver tanto mecanismos centrais quanto periféricos. Porém, os mecanismos da anti-nocicepção do ODC testado no presente estudo somente poderão ser elucidados com futuros estudos adicionais empregando antagonistas farmacológicos dos principais neurotransmissores envolvidos com a modulação central da nocicepção bem como da quantificação dos principais mediadores periféricos da inflamação tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e PGE2. Este novo efeito comprobatório pode ser útil no tratamento de distúrbios algésicos (GOMES et al. 2007).

Neste estudo, observou-se que o OBC na dose de 100 mg/kg atenuou principalmente a primeira fase do edema de pata e foi menos intenso na terceira fase, enquanto que o ODC na dose de 100mg/kg não inibiu a intensidade e nem interferiu significativamente no desenvolvimento do edema na primeira fase, no entanto, atenuou somente a terceira fase de desenvolvimento do edema induzido por carragenina. Portanto, é possível sugerir que o efeito anti-inflamatório do OBC esteja associado à interferência da ação de mediadores pró-inflamatório da primeira e segunda fase, tal como a bradicinina, enquanto que o efeito anti-inflamatório do ODC é possível estar associado à interferência da ação de mediadores pró-inflamatório da 3ª fase, tal como a PGE2. Esses resultados foram significativos, porém, menos intensos em comparação ao grupo tratado com

indometacina, a qual atenuou significativamente tanto a intensidade quanto a duração do edema induzido por carragenina.

O teste de úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto teve como objetivo avaliar qualitativamente a provável proteção gástrica do OBC e ODC em relação ao estresse, ao uso etanol. Após jejum de 18 h, os ratos (n = 6/grupo) foram pré-tratados por via oral (gavagem, 10mL/kg) com ODC (100% ou 400 mg/kg) ou OBC (100% ou 400 mg/kg) ou controle negativo (NaCl 0,9%). Após 1 hora, foi administrado 4 mL/kg de etanol absoluto (agente lesivo) aos animais por via oral. Decorrida 1 hora dessa administração, os ratos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura. Em seguida, foram fotografados e as lesões contadas através de planimetria computadorizada. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (ALU) (mm<sup>2</sup>). Os dados referentes aos efeitos do OBC e ODC sobre as lesões gástricas induzidas por estresse demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Nas doses de OBC 100% (10 mL/kg) e ODC 100% (10 mL/kg) apresentaram os maiores valores de média, enquanto que, com referência aos efeitos do OBC na dose 400mg/kg e do ODC 400mg/kg diluídos em NaCl 0,9% sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos, foi possível verificar que embora havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, os mesmos apresentaram valores menores do que na dose de 100% de ambos os óleos. Esses resultados estão de acordo com os efeitos do óleo-resina obtido da *Copaifera langsdorffii* em lesões gástricas induzidas pelo etanol, indometacina e por estresse hipotérmico em ratos e que após administração oral das doses de 200 e 400 mg/Kg proporcionou proteção significativa, dose-dependente, contra o dano gástrico causado pelo etanol e estresse hipotérmico, e na dose de 400 mg/Kg também preveniu a ulceração gástrica induzida pela indometacina. (PAIVA et al., 1998).

A NE 15% e ODC foram testadas em modelo de pleurisia induzido por LPS *in vivo*, nesse experimento, grupos de camundongos Balb/C foram previamente tratados com NE15% e dexametasona. Após 1 h de tratamento, foram desafiados com LPS 250 ng/cavidade e após 8 h realizado o lavado pleural para contagem dos leucócitos em modelo de pleurisia induzido por LPS. Assim, foi observado que tanto o ODC quanto NE15% administrados por via oral (100 mg/kg) não inibiram a migração dos leucócitos totais, leucócitos mononucleares e neutrófilos, conseqüentemente, não inibiram o extravasamento de líquido, e nem na migração de leucócitos quando comparado com a dexametasona, não sendo, portanto, a via que demonstra a atividade anti-inflamatória tanto do ODC quanto da NE15%. Por outro lado, os efeitos farmacológicos de três óleo-resinas foram avaliados *in vivo*, utilizando o modelo de pleurisia induzida por zymosan em camundongos. O óleo de copaíba de *Copaifera multijuga* Hayne (100 mg/kg) foi o mais potente, inibindo a pleurisia induzida pelo zimosan. Os óleo-resinas de *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke também inibiram a pleurisia, mas com menor intensidade. (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Os dados demonstraram que os óleo-resinas de copaíba apresentaram efeitos anti-inflamatórios *in vivo* baseados na redução da migração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos e para o agente quimiotático solução de lipopolissacarídeo, respectivamente (KOBAYASHI et al., 2011), esses efeitos dos óleo-resinas se devem provavelmente a associação dos terpenos e sesquiterpenos fato o que não acontece quando se usa o ODC isoladamente, tendo em vista que a própria NE15% também não produziu tal efeito.

Ainda com o intuito de verificar a capacidade anti-inflamatória do ODC e da NE15% frente a diferente via de aplicação, foi utilizado o modelo de edema de orelha induzido por fenol. Após a aplicação do fenol 10% (v/v), grupos de camundongos (Swiss, n = 6) receberam aplicação tópica 20µL na orelha direita de óleo de copaíba



puro (OBC); ODC, NE 15% e dexametasona 0,005 mg/sítio (controle positivo). O grupo controle inflamado recebeu a aplicação tópica de nanoemulsão base (veículo), após a aplicação do fenol na orelha direita. A orelha direita ficou em condições normais. Uma hora após a aplicação do fenol, o tecido das orelhas foi seccionado e pesado para a determinação do edema (g). Os resultados mostraram o efeito anti-inflamatório tópico do óleo de copaíba puro (OCP), ODC, NE 15% e dexametasona, a NE 15% se mostrou a mais potente de todas as preparações inclusive em relação ao da dexametasona, é possível que a NE15% iniba a geração de radicais livres uma importante via para a toxicidade dérmica dos compostos fenólicos, uma vez que a presença de ROS causa um aumento na produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , LTs e PGs, os quais provavelmente são responsáveis pela resposta inflamatória que se segue a exposição ao fenol, já que esses mediadores amplificam a resposta inflamatória estimulando outras citocinas e mediadores (MURRAY et al., 2007).

No teste da artrite, um edema de pata foi induzido na pata direita traseira dos camundongos por injeção subplatar de uma suspensão de zymosan (500 $\mu$ g/pata) em solução salina estéril (0.9%). Na pata esquerda foi injetada solução salina (controle negativo) (WINTER et al., 1962). As diferentes preparações, óleo de copaíba puro (OCP); ODC, nanoemulsão base (NE); NE 15% 600mk/kg/dia e 100 mg/kg/dia de diclofenaco de sódio (DS-controle positivo) foram administrados trinta minutos antes da administração do zymosan nas patas traseiras dos camundongos. O grau de edema foi medido imediatamente antes e 6, 12 e 24 h depois da injeção de zymosan utilizando o paquímetro digital em milímetros (mm). Para cada animal foi avaliada cada pata individualmente, somando-se o escore de todas as patas de cada camundongo (escore máximo 16/camundongo). A diferença entre o edema das patas, determinada antes e

depois da injeção do agente provocador do edema, indicou a gravidade do mesmo, e foi avaliada como a porcentagem da diferença entre o volume da pata em cada ponto de tempo e o volume da pata basal (controle negativo).

O efeito NE 15% demonstrou que possui melhor efeito melhor que o ODC ou o OBC sobre a artrite induzida pelo zymosan em camundongos sobre a artrite induzida pelo zymosan e que a mesma produziu um efeito antiartrítico melhor do ODC. Estudos recentes demonstraram que um dos principais componentes do óleo, o  $\beta$ -Car é um potente anti-inflamatório. (LUCCA et al., 2015). O  $\beta$ -Car foi testado na inflamação sistêmica, no estado oxidativo e no metabolismo de células hepáticas de ratos com artrite induzida por adjuvantes, um modelo para a artrite reumatóide, uma patologia autoimune experimental que compartilha muitas características com a artrite reumatóide humana. Essas ações benéficas foram da mesma extensão do óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*) e, portanto, o  $\beta$ -Car é possivelmente responsável pelas ações anti-inflamatória e antioxidante do óleo que foi pontencializado quando apresentado na forma nanoemulsionada. Esses resultados revelam que o  $\beta$ -Car melhora a inflamação sistêmica e o estado oxidativo de ratos com artrite e, além disso, não está associado à hepatotoxicidade (CASTRO GHIZONI et al., 2017; AMES-SIBIN et al., 2018).

Em resumo, o presente trabalho apresenta uma caracterização química e biológica da fração volátil da resina de copaíba, e de forma inédita desenvolveu uma nanoformulação contendo esta fração e, além disso, apresenta uma serie de achados farmacológicos importantes para aplicação tanto do óleo destilado como da nanoformulação em processos fisiopatológicos. Destacando os resultados obtidos com a NE15% em diferentes ensaios *in vivo* que demonstraram a atividade anti-inflamatória e baixa toxicidade é possível que esse produto possa ser utilizado tanto na terapêutica humana quanto animal. Contudo, salientamos que outros estudos de abordagem sobre o

mecanismo de ação na terapêutica inflamatória devem ser realizados a fim de que o produto seja utilizado com segurança.

## 6. CONCLUSÕES

1. O óleo destilado de copaíba mostrou-se como um produto líquido, amarelo claro, odor característico, densidade de 0,8942 g/mL, com viscosidade 10,7 cPS e pH entre 6 e 7, contendo como principal componente químico, o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -Car), o qual pode ser utilizado como marcador químico deste produto.

2. Foi possível obter uma nanoemulsão contendo 15% do óleo destilado de copaíba com tamanho de partícula  $99.47 \pm 0.64$  nm, polidispersão de  $0.224 + 0.010$ , potencial zeta  $-37.10 \pm 0.26$  mV e condutividade igual a  $0.009 \pm 0.000$  m $\Omega$ /cm.

3. O óleo destilado de copaíba foi mais citotóxico do que o óleo de copaíba bruto em fibroblastos humanos MRC5.

4. A nanoemulsão contendo 15% de óleo destilado de copaíba mostrou-se de baixa citotoxicidade no ensaio de viabilidade celular em fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5) e em macrófagos murinos (J744).

5. A nanoemulsão foi capaz de promover a inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS em concentração menor do que o óleo destilado ou a resina de copaíba.

6. No ensaio de toxicidade aguda oral tanto a NE15% quanto o óleo destilado de copaíba, na dose máxima de 2000 mg/kg não levou a morte de nenhum animal (camundongo Balb C) até 14 dias após a administração.

7. Tanto óleo bruto de copaíba quanto o óleo destilado de copaíba, quando administrados por via oral, na dose de 100mg/Kg, mostraram intensa atividade anti-nociceptiva, similar às substâncias padrão testadas (indometacina ou morfina) em camundongos.

8. No teste de edema de pata de camundongos induzido por carragenina, a resina bruta produziu efeito anti-edematogênico na primeira e quarta hora, já o óleo destilado somente na quarta hora após a administração por via oral;

9. Tanto o óleo destilado quanto a resina bruta mostraram atividade anti-ulcerogênica sobre as lesões gástricas induzidas por estresse, nas doses de 10 mL/kg e 400mg/kg em ratos;

10. Tanto a nanoemulsão contendo 15 % de óleo destilado de copaíba quanto o óleo destilado de copaíba não reduziram a migração de leucócitos para o peritônio provocado pelo LPS em camundongos.

11. A nanoemulsão contendo 15 % de óleo destilado de copaíba mostrou ter atividade anti-inflamatória tópica similar a dexametasona e muito maior do que o óleo destilado de copaíba em modelo de edema de orelha induzido por fenol em camundongos;

12. A nanoemulsão contendo 15 % de óleo destilado de copaíba produziu efeito antiartrítico melhor que o óleo destilado ou a resina bruta de copaíba sobre a artrite induzida pelo zymosan em camundongos;

13. Os achados do presente estudo são importantes para aplicação do óleo destilado de copaíba ou da sua formulação em nanoemulsão em produtos a serem utilizados tanto na terapêutica humana quanto animal principalmente de processos inflamatórios.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARABI, S.; LONGAKER, M. T.; GURTNER, G. C. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. **PLOS Medicine**. n. 4, p. 234, 2007.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008. 564 p.

ABBAS, M.A.; TAHA, M.O.; ZIHLIF, M.A.; DISI, A.M.  $\beta$ -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**. v. 702, p.12-19, 2013.

ABREU MATOS, F.J.A. *Farmácias vivas sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. **Editora UFC**. 4ª Ed. Fortaleza, 2002.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4.Ed. **Carol Stream: Allured Publishing**, Corp, 2007. 803p.

AGUIAR, G.P.; CARVALHO, C.E.; DIAS, H.J.; REIS, E.B.; MARTINS, M.H.; WAKABAYASHI KA GROppo, M; MARTINS, C.H.; CUNHA, W.R.; CROTTI, A.E. Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. **Natural Product Research**. v. 27, n. 18, p. 1668-1672, 2013.

AJUEBOR, M.N., DAS, A.M., VIRÁG, L., FLOWER, R.J., SZABÓ, C., PERRETTI, M., Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **Journal Immunology Research**. 162,1685–1691, 1999.

ALAM, S; SUSAN, T.; JOY, S.; KUNDU, A.B. Antiinflammatory and antipyretic activity of vicolides of *Vicoa indica* DC. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 30, n. 1, p. 38-41, 1992.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma População natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia Central. 4 – Interpretação de dados fenológicos em relação a elementos climáticos. **Acta Amazonica**, v.18, p. 199-209, 1988.

ALFORD, J.G.; STANLEY, G.; TODDERUD, G.; TRAMPOSCH, K.M. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Agents and Actions**, v. 37, p. 260-267, 1992.

ALLEN-JÚNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8º ed, São Paulo: **Artmed**, 2007, 775 p.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.

AL-HARBI, M.M.; QURESHI, S.; AHMED, M.M.; RAZA, M.; MIANA, G.A.; SHAH, A.H. Studies on the antiinflammatory, antipyretic and analgesic activities of santonin. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 64, n. 3, p.135-139, 1994.

AMES-SIBIN, A.P.; BARIZÃO, C.L.; CASTRO-GHIZONI, C.V., SILVA, F.M.S.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C.A.; MARÇAL-NATALI, M.R.; BRACHT, A.; COMAR, J.F.  $\beta$ -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2018 Dec;119(12):10262-10277.

AMINOSHARIAE, A.; KHAN, A. Acetaminophen: old drug, new issues. **Journal of Endodontics**. 2015 May;41(5):588-93

ARSATI, F.; VEIGA, M.C.F.A. Efeito do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido pelo óleo de mostarda na ATM de ratos. Tese de mestrado, **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo. (1999).

ARROYO-ACEVEDO, J.; QUINO-FLORENTINI, M.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ALMORA-PINEDO, Y.; ALBA-GONZÁLEZ, A.; CONDORHUAMÁN-FIGUEROA, M. Cicatrizing effect of *Copaifera officinalis* (copaiba) oil in patients with peptic ulcer. **Anales de la Facultad de Medicina**. v. 72, n. 2, p.113-117, 2011.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p.385–406, 2012.

BADKE, M. R. BUDO, M.L.D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas Medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola de Enfermagem Anna Nery**, v. 15, n. 1, 2011.

BAHI A, A.L.; MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, .; NURULAIN, S.M.; OJHA, S.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**. v. 135, p. 119-124. 2014.

BALLOU, S. P.; KUSNHER, I. **Laboratory evaluation of inflammation**. In: KELLEY, W. N. et al., ed. Textbook of rheumatology. Philadelphia, **W. B. Saunders**, p. 671-680, 1993.

BANDONI, A.L. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. – 2ª. ed.– Buenos Aires: **el Autor**, 2003.

BALDISSERA, M.D.; SOUZA, C.F.; GRANDO, T.H.; DOLESKI, P.H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S.G. Hypolipidemic effect of  $\beta$ -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn Schmiedebergs Archive Pharmacology**. 390(2):215-223. Feb, 2017.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The perception of pain. In: Kandel, ER.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. Principles of Neuroscience. New York: **Appleton and Lange**. p. p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A.L.; BAUTISTA, D.M.; GRÉGORIO SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell Research**. v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Histochemical**. v. 116, n. 8, p. 1469-1479, 2014.

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**. v. 245, p. 50-58, 2016.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.; FREITAS, P.C.; ZANINI, A.C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, n. 1, p. 101-109, 1988.

BATTISTI, C. GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M.R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **The Journal of Immunology**. Today, v. 15, p. 74-80. 1994.

BECHER, P. Emulsions; theory and practice. 3rd. Ed. New York: **Oxford University Press**, 2001.

BEKTAS, N. NEMUTLU, D.; ULUGBAY, G.; ARSLAN, R. The role of muscarinic receptors in pain modulation. **World Journal of Pharmaceutical and Medical Research**. v. 1, n. 1, p. 40-49, 2015.

BENTO, A.F.; MARCON, R.; DUTRA, R.C.; CLAUDINO, R.F.; COLA, M.; LEITE, D.F.; CALIXTO, J. B.;  $\beta$ -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR $\gamma$  pathway. **The Journal of Pathology**. v. 178, n. 3. p. 1153-1166, 2011.

BERNARDI, D. S. Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase. Dissertação (Mestrado em Ciências), **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2011.

BEZERRA, W.K.T; MARIA DAS GRAÇAS DAS SILVA, M.G.; BEZERRA, A.M.F.; BEZERRA, K.K.S.; VIEIRA, A.L.; PEREIRA, D.S.; BORGES M.G.B. O uso de fitoterapia com ação anti-inflamatória que atuam no sistema gênitourinário. **INTESA (Pombal - PB - Brasil)** v. 8, n. 1, p. 24-36, 2014.



BLAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F.C.; 2, LIMA, M.P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16(2): 230-235, Abr./Jun. 2006.

BLAZSO, G.; GABOR, M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. **Prostaglandins**, v. 50, p. 161-168, 1995.

BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S.G. Hypolipidemic effect of  $\beta$ -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. v. 390, n. 2, p. 215-223, 2017.

BOLON, B.; STOLINA, M.; KING, C.; MIDDLETON, S.; GASSER, J.; DEBRA ZACK, D.; FEIGE, U. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2011, p. 21, 2011.

BOUCEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRIER, E.; FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 280, 2004.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: **Anvisa**, p. 130, 2007.

BRAGA, M. P.; SILVA, C.B.; ADAMS, A. I. H. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. **Saúde (Santa Maria)**, v.37, n.2, p. 1932, **Ahead of Print**.2011.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A.F.; MEIO, M.C.F. Efeito do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Revista Paraense de Medicina**.1998; 12(1): 28-32.

BRITO, M.V.H.; OLIVEIRA, R.V.B.; MIRANDA, J.S.; REIS, J.M.C. Efeito do óleo de copaíba no estômago de ratos. In: Congresso Paraense de Gastroenterologia, 1, Belém, agosto de 1999, ANAIS, PARA, Walter Rocha, **Revista Paraense de Medicina** 1999a, p. 300 Resumo 35.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M.J.; PESSOA, A.F.; MEIO, M.C.F. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Revista Paraense de Medicina**. 1999b; 13(1): 12-17.

BRITO, M.V.H.; OLIVEIRA, R.V.B.; MORAIS, M.R.; MIRANDA, J.S.; REIS, J.M.C. 2001. Análise gástrica após administração de copaíba: estudo

experimental em ratos. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva** 20: 78-82.

BROCKSOM, T.J.; DE OLIVEIRA, K.T.; DESIDERÁ, A.L. The chemistry of the sesquiterpene alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society.**, v. 28, n. 6, p. 933-942, 2017.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZ, G.A. Analgesicos-antipiréticos: farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L.L.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: **Mcgraw-hill**, 2006.

CALLEJA, M.A.; , VIEITES, J.M.; MONTERO-MELÉNDEZ, T.; TORRES, M. I.; FAUS, M.J.; GIL, A.; SUÁREZ, A. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition.** v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.

CAMARGO, M.F.P. Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos), **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2008.

CAMILE, G. S., MARIA, L. F., JULIANA, A. S., OSMAR, A. L., ELOISA, D. C. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

CAPEK, I., Degradation of kinetically-stable o/w emulsions, *Advances in Colloid Interfacial Science*, Amsterdam, v. 107, p. 125-55, 2004.

CARDOSO, M.L. Efeito das frações obtidas da Fucoídina de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por zymosan. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal. 2007.

CARVALHO, A.M.R. Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (o-metil-n-2- hidroxibenzoil tiramina) em modelos experimentais. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza.

CARVALHO, F.M.; BROGDEN, N.K.; SLUKA, K.A.  $\beta$ -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Science.** v. 149, p. 34-41, 2016.

CARVALHO, J.C.T. Constituintes de plantas com atividade anti-inflamatória. CARVALHO, J.C.T. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: **Tecmedd**, 2004.

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

CASTRO GHIZONI, C.V.; ARSSUFI AMES, A.P.; LAMEIRA, O.A.; BERSANI AMADO, C.A.; SÁ NAKANISHI, A.B.; BRACHT, L.; MARÇAL NATALI, M.R.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; COMAR, J.F. Anti-inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2017 Oct;118(10):3409-3423.

CAUWENBERGH, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. **Clinical Dermatology**. v. 20, p. 467-473, 2002.

CHANAMAI, R.; HORN, G.; McCLEMENTS, D.J. (2002). Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by weakly adsorbing biopolymer or a nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, 247, 167.

CHAUDHARI, Y. Nanoparticles - A paradigm for topical drug delivery. **Chronicles of a Young Scientist**, v. 3, n. 1, p. 82-5, 2012.

CHAN, F. K.; LEUNG, W. K. Peptic-ulcer disease. **Lancet**, v. 360, p. 933-941, 2002.

CHANG, H.J.; KIM, J. M.; LEE, J. C.; , KIM, W.K.; CHUN, H.S. Protective effect of  $\beta$ -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. **Journal of Medicinal Food**. v. 6. p. 471-480, 2013.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade tóxica e mutagenica do óleo de copaiba (*Copaifera langsdorfii* desfon) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 37-40, 2002.

CHO, H.I.; HONG, J.M.; CHOI, J.W.; CHOI, H.S.; KWAK, J.H.; LEE, D.U., KOOK LEE, S.; LEE, S.M.  $\beta$ -Caryophyllene alleviates D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**. v. 764, p. 613-21, 2015.

CLARK, A. Natural Products. WILLIAMS, D. LEMKE, T.L. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5 ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2002.

COATES, N.J.; MCCOLL, S.R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **Journal of Immunology Research**., v.166, p. 5176-5182, 2001.

CONTE, F. P.; FERRARIS, F.K.; COSTA, T.E.; PACHECO, P.; SEITO, L.N.; VERRI, W.A. JR; CUNHA, F.Q.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M.G. Effect of gedunin on acute articular inflammation and hypernociception in mice. **Molecules**. v. 20, p. 2636-57, 2015.

COUTO VM, VILELA FC, DIAS DF, SANTOS MH, SONCINI R, NASCIMENTO CG, GIUSTI-PAIVA A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 134, n. 2, p. 348–353, 2011.

CROSS, M.; SMITH, E.; HOY, D.; NOLTE, S.; ACKERMAN, I., FRANSEN, M. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 73, n. 7, p. 1316-22, 2014.

CRUCIANI R. A., NIETO M. J. Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. **Revista de la Sociedad Española del Dolor** v. 5, p. 312-327, 2006.

CRUZ, F. F. Efeito da cafeína e dos receptores de adenosina na inflamação induzida por cobre em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, PUCRS, Porto Alegre, 2016.

DIAS, D.O; MARIANA COLOMBO, KELMANNA, R.G.; SAMUEL KAISERA, S.; LUCCA, L.G.; TEIXEIRA, H.F.; LIMBERGERA, R.P.; VALDIR F. VEIGA JR., V.F.; LETÍCIA S. KOESTERA, L.S. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products** 59 (2014) 154–162

DIMER, F. A.; FRIDRIC, R.B.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DIOP-FRIMPONG, B., CHAUHAN, V.P., KRANE, S., BOUCHER, Y., JAIN, R.K.; LOSARTAN inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011, *108*(7), 2909.

DI SOTTO, A, MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**. v. 699, p. 23-28, 2010.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. “Nanotecnologia”. São Paulo, **Artlíber**, p.1-201, 2006.

DWYER, J. D. Tropical Woods. **Brittonia**. v. 83, n. 15, 1945.

DWYER, J.D. The Central American, west Indian, and South American species *Copaifera* (Caesalpiniaceae). **Brittonia**. v. 7, n. 3, p. 143-72, 1951.

ELISSALDE, M. H.; IVIE, G.W.; ROWE, L.D.; ELISSALDE, G.S. Considerations of the structure of sesquiterpene lactones on biological activity: influence of the alpha-methylene-gamma-lactone moiety on mast cell degranulation. **American Journal of Veterinary Research**. v. 44, n. 10, p. 1894-1897, 1983.

ERNST, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. **British Journal of Dermatology**, v.143, p. 923-929, 2000.

ESQUENA, J; SOLANS, C. Influence of the HLB parameter of nonionic surfactants on normal and reversed-phase thin layer chromatography. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 189, p.85-92, 2001.

FARZAEI, M.H., ABDOLLAHI, M., RAHIMI, R., Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World Journal of Gastroenterology** v. 21, p. 6499-6517, 2015.

FELDBERG, W.; GUPTA, K.P. Pyrogen fever and prostaglandin-like activity in cerebrospinal fluid. **The Journal of Physiology** 228(1):41-53. February 1973.

FELTENSTEIN, M. W.; SCHÜHLY, W.; WARNICK, J.E.; FISCHER, N.H.; SUFKA, K.J. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from Magnolia and Bear's foot. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 79, n. 2, p. 299-302, 2014.

FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam. **Revista Brasileira de Farmácia**. 73, p. 53-6, 1992.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**. v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERNANDEZ, P., ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A.; Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERRARI, F.C.; FERREIRA, L.C.; SOUZA, M.R.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 3, p. 384-389, 2013.

FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. Vol 1. 3ª Ed. **Pharmabooks**. São Paulo. p. 369, 2008.

FERREIRA, M.A.D.; NUNES, O.D.R.H.; FONTELE, J.B.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v. 11, n. 4, p. 315–322, 2004.

FERREIRA, T.V.C., Polímeros condutores e monocamadas automontadas na concepção de novas arquiteturas contendo nanopartículas: preparação, caracterização e desempenho para eletro catálise e Bio sensores. Tese de Doutorado (Doutorado em Química). **Universidade de Lisboa**, 2011.

FILADELPHO, A. L.; ARTONI, S.M.B; ORSI, A.M; DIAS, L.G.G.G.; CBRINI, T.M.; BARIANI, M.H.; LOT, R.F.S. Aspectos histológicos do implante de matrizes de

colágeno no tecido subcutâneo de ratos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.7, n. 12, 2009.

FIGUEIREDO J. Nanomedicina: ficção ou realidade? **Universidade do Algarve**. CNA – Centro para automação em nanobiotecnologia. 04 de dezembro de 2009. Disponível em: [http://www.observatoriodoalgarve.com/cna/opinioes\\_ver.asp?opinio=683](http://www.observatoriodoalgarve.com/cna/opinioes_ver.asp?opinio=683)> Acesso em: 25 de novembro de 2015.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência de processos Redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.1, p. 17-24, jan/fev, 2008.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FRIEDMAN, R.; HUGHES, A. L. Molecular evolution of the NF- $\kappa$ B signaling system. **Immunogenetics**, v. 53, p. 964–974, 2002.

GABOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapeste: **Akadémiai Kiadó**, 2000.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.; FLORENTINO, I.F.; LINO, R.C.; FAJEMIROYE, J.O.; CHAIBUB, B.A.; DE PAULA, J.R.; DE LIMA, T.C.; COSTA, E. A. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component,  $\beta$ -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 38, n. 2, p. 276-284, 2012.

GARRIDO, A.D.; LIA, R.C.; FRANÇA, S.C.; DA SILVA, J.F.; ASTOLFI-FILHO, S.; SOUSA-NETO, M.D. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. **International Endodontic Journal**. v. 43, n. 4, p. 283-91, 2010.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; MAFFEI FACINO, R. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**. 2013 Jan 20;440(2):170-8.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, n. 3, p. 486-492, 2007.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P; HOVELL, A.M.; LANDGRAF R.G.; MATHEUS, M.E.; PINTO., A.D.A.C; FERNANDES, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 2, n. 119, p. 179-184, 2008.

GOMES, N.M.; DE REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.D.A.C; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 2, n. 128, p. 177-183, 2010.

GONÇALVES, E.S.; WANDERLEY, A.G. Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae). Tese (doutorado) – **Universidade Federal de Pernambuco**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife. 2014.

GOU, M., SHI, H., GUO, G., MEN, K., ZHANG, J., ZHENG, L., LI, Z., LUO, F., QIAN, Z., ZHAO, X., WEI, Y.; Improving anticancer activity and reducing systemic toxicity of doxorubicin by self-assembled polymeric micelles. **Nanotechnology** **2011**, 22(9), 095102.

GOWDA, P.J.; RAMAKRISHNAIAH, ; KRISHNA, V.; NARRA, S.; JAGANNATH, N. Caryophyllene-rich essential oil of *Didymocarpus tomentosus*: chemical composition and cytotoxic activity. **Natural Product Communications**. V. 7, n. 11, p.1535-1538, 2012.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [N15 nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 26, p. 131-138, 1982.

GRIFFIM, W.C. Classification of surface-active agentes by HBL. **Society of Cosmetic Chemists**, n. 1, p. 311,1954.

GUIMARÃES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I.R.; LIMA, R.R.; PEREIRA, A.; MOURA, L.S.; CARVALHO JR, R.N.; LAMEIRA, O.; GOMES-LEAL, W. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

GULLAPALLI, R.P.; SHETH, B.B., Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 1999; 48(3):233-8.

GUO, K.; MOU X; HUANG, ; XIONG, N.; LI, H. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in microglia. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

GUPTA, A; ERAL, H.B.; T. ALAN HATTONA, T.A.; DOYLE, P.S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, 2016, 12, 2826—2841

HALL, I.H.; STARNES, C.O. JR; LEE, K.H.; WADDELL, T.G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 69, n. 5, p. 537-543, 1980.

HERNÁNDEZ, V; MÁÑEZ, S.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; RÍOS, J.L. Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a

pharmacophoric conjugated diene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 26, n. 2, p. 162-169, 2005.

HERRERO-JÁUREGUI, C.; CASADO, M.A.; DAS GRAÇAS BICHARA ZOGHBI, M, CÉLIA MARTINS-DA-SILVA, R. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, n. 4, p. 674-685, 2011.

HESS, S. Atividade antinociceptiva do ácido mirsinóico B. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), **Universidade do Vale de Itajaí**, Santa Catarina, 107 f, 2006.

HÖGESTÄTT, E.D.; JÖNSSON, B.A.; ERMUND, A.; ANDERSSON, D.A.; BJÖRK, H.; ALEXANDER, J.P.; CRAVATT, B.F.; BASBAUM, A.I.; ZYGMUNT, P.M. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Journal of Biological Chemistry**. 2005 Sep 9;280(36):31405-12.

HOLMQVIST, M.E.; WEDREN, S.; JACOBSSON, L.T. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. **Journal of International Medical Research**. v. 268, n. 6, p. 578-85, 2010.

HORVÁTH, B., MUKHOPADHYAY, P.; KECHRID, M.; PATEL V, TANCHIAN, G.; WINK, D.A.; GERTSCH, J.; PACHER, P.  $\beta$ -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 52, n. 8, p. 1325-1333, 2012.

HUSNKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** v. 30, p. 103-119, 1987.

IIZASA H, ISHIHARA S, RICHARDO T, KANEHIRO Y, YOSHIYAMA H. Dysbiotic infection in the stomach. **World Journal of Gastroenterology**. v. 21, p. 11450-11457, 2015.

JAGDALE, S. C.; SHAH, T. P.; KUCHEKAR, B. S.; CHABUKSWAR, A.R.; BAVISKAR, D.T. Cancer nanotechnology. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 3, n.1, p. 4-8, 2009.

JONES, S.L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R.S., HORD, A.H., GINSBERG, B., PREBLE, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St Louis: Mosby-Year Book, 1992.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, p. 203-210, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. Princípios da neurociência. 4. ed. São Paulo, SP: **Manole**, p. 472-489, 2003.



KANGWAN N, PARK JM, KIM EH, HAHM KB. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**. v. 5, p. 40-47, 2014.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T; NAGAOKA, K.; NAKAMURA, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in  $\beta$ -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**. v. 17, n. 5, p. 664-675, 2013.

KELANY, M. E.; ABDALLAH, M.A. Protective effects of combined  $\beta$ -caryophyllene and silymarin against ketoprofen-induced hepatotoxicity in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 94, n. 7, p. 739-744, 2016.

KLAPSCHINSKI, T. A.; RABE, P.; DICKSCHAT, J. S. Pristinol, a sesquiterpene alcohol with an unusual skeleton from *Streptomyces pristinaespiralis*. **Angewandte Chemie International**. Ed. 55, (34):10141-44. 2016.

KLAUKE, A.L.; RACZ, I.; PRADIER, B.; MARKERT, A.; ZIMMER, A.M.; GERTSCH, J.; ZIMMER, A. The cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**. p. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.

KLAUMANN, P.R., WOUK, A.F.P.F., SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T.O.; ENZWEILER, B.G.; DE BONA, L.R.; MASSONI, T.; APEL, M.A., HENRIQUES, .A.T.; RICHTER, M.F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E.S. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Journal of Pharmaceutical Biology**. v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KOLACZKOWSKA, R., ANDERSIN, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceeding.**, v.18, p.412-416, 1959.

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

KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**. v. 48-49, p. 26-30, 2014.

KUKAR, M.; PETRYNA, O.; EFTHIMIOU, P. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. **Biologics**. v. 3, p. 443-57, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: **Elsevier Health Sciences**. 2012.

KWOK, B.H.; KOH, B.; NDUBUISI, M.I.; ELOFSSON, M.; CREWS, C.M. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase. **Chemical Biology**. v. 8, n. 8, p. 759-766, 2001.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Tradução de João F. Pinto e Ana Isabel Fernandes. 2. ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, v. 2, 2010. Título original: The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.

LAFOURCADE P.A.; KEITA H.; PEREIRA S.T.; LIMA S.E.; ROSALES A.L.D.; AMAZONAS S.M.J.; TAVARES C.J.C.; RODRIGUEZ A.J.R. 2018. *Cassia grandis* Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent  $\alpha$ -glycosidase and pancreatic lipase inhibitor effect. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 27(2): 191-199.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P.C.; NEVES, J.K.; DA SILVA J.A.; DA VEIGA-JUNIOR V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**. v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

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

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A.A.; PORTO, R.S.; CELEDÔNIO, N.R.; OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA, R.F.; SILVA, L.P.; GARCIA-TEÓFILO, T.M.; SILVA, A.P.; , MAGALHÃES, P.J.; DUARTE, G.P.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. . Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent  $\beta$ -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 24, n. 6, p. 749-758, 2010.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacological Research**. v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.

LIMA, C.S. Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleo-resina de *Copaifera duckei* Dwyer (subcrônico e reprodutivo) orientador, José Carlos Tavares Carvalho. Tese (doutorado) – **Fundação Universidade Federal do Amapá**, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, -- Macapá, 265 f, 2014.

LIMA, R.R.; COSTA, A.N.R.; DE SOUZA, R.D.; Wallace GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina** v. 21, n. 2 2007.

LIMA, S.R.; JUNIOR, V.F.; CHRISTO, .H.B; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**. v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

LOPES, J.M.C. Fisiopatologia da Dor. **Permanyer**. Portugal, 2003.

LORKE, D.A. New approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology** v. 54, p. 275-287, 1983.

LUCCA, L.G.; DE MATOS, S.P.; BORILLE, B.T.; DE O. DIAS, D.; TEIXEIRA, H.F.; VEIGA V.F. JR; LIMBERGER, R.P.; KOESTER, L.S. Determination of  $\beta$ -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**. 2015 Feb;104:144-8.

LUI, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of parafin oil-in-water nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, p. 557-563, 2005;

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, p. 1449-1461, 2009.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 48907-48913, 2003.

MAREK, G.J.; AGHAJANIAN, G.K. (1998). 5-HT-induced EPSCs in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by  $\mu$ -opiate receptor activation. **Neuroscience**, 86:485-497.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; ELEMSON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. Nanoemulsions formation, structure and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 635, 2006.

MATSUDA, N.M.; MAIA, C.C.; TRONCON, L.E.A. Dispepsia funcional: revisão de diagnóstico e fisiopatologia. **Diagnóstico e Tratamento**. v. 15, n. 3, p. 114-116, 2010.

McKINNON, R.; BINDER, M.; ZUPKÓ, I.; AFONYUSHKIN, T.; LAJTER, I.; VASAS, A.; DE MARTIN, R.; UNGER, .; DOLZNIG, H.; DIAZ, R.; FRISCH, R.; PASSREITER, C.M.; KRUPITZA, G.; HOHMANN, J.; KOPP, B.; BOCHKOV, V.N. Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass. **Phytomedicine**. v. 21, n. 12, p. 1695-1701, 2014.

MCMAHON, S.B.; BENNETT, D.L.H.; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon, SB.; Koltzenburg, M., editors. Wall and Melzack's textbook of Pain. **Elsevier** p. 49-72, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MELO, J.O.; TRUITI, M.C.T.; MUSCARÁ, M.N.; BOLONHEIS, S.M.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Anti-

inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.11, p. 2241-2245, 2006.

MENEZES, R.R. Monoartrite induzida por adjuvante completo de freund em ratos holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com tiamina ou riboflavina. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências 66 Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte. 2013.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pelvic Pain, **IASP Press**, Seattle, Wash, USA, 2nd edition, 1994.

MEYAGUSKU, V.M. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Araraquara-SP, 2014.

MISHRA, D.; BISHT, G.; MAZUMDAR, P.M.; SAH, S.P. Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. **Journal of Pharmaceutical Biology**. v. 48, n. 11, p. 1297-1301. 2010.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia: processos gerais. 4, ed., São Paulo: **Atheneu**, 1999.

MORALES, D.; GUIERRREZ, J.M.; GRACIA-CELMA, M.J.; SOLANS, Y.C. A study o the relation between biocontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir**, v.19, p. 7196-7200, 2003.

MOREIRA, V.F.; SAN ROMÁN, A. L. **Revista Española de Enfermedades Digestivas (Madrid)** v. 96, n. 1, p. 81-82, 2004.

MORIMOTO, Y.; OSHIMA, S.; HARA, H.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 57, p. 495-505, 1991.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in molecular biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MORRISIN, I. D; ROSS, S. Emulsions. Colloid dispersions- suspensions Emulsions and Foams, Nem York: **Jhon Eilley Sons**, 2002.

MOSER, V.C.; TILSON, H.A.; MCPHAIL, R.C.; BECKING, G.C.; CUOMO, V.; FRANTIK, E.; KULIG, B.M.; WINNEKE, G. 1197a. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: II. Protocol design and testing procedures. **Neurotoxicology** 18: 929-938.

MOSER, V.C.; BECKING, G.C.; CUOMO, V.; FRANTIK, E.; KULIG, B.M.; MCPHAIL, R.C.; TILSON, H.A.; WINNEKE, G.; BRIGHTWELL, W.S.; CAGIANO,

R.; GILL, M.W.; HAGGERTY, G.C.; HORNYCHOVA, M.; LAMMERS, J.; LARSEN, J.J.; MCDANIEL, K.L.; NELSON, B.K.; OSTERGAARD, G. 1997b. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: III. Results of proficiency studies. **Neurotoxicology** 18: 939-946.

MOSER, V.C.; BECKING, G.C.; CUOMO, V.; FRANTIK, E.; KULIG, B.M.; MCPHAIL, R.C.; TILSON, H.A.; WINNEKE, G.; BRIGHTWELL, W.S.; DE SALVIA, M.A.; GILL, M.W.; HAGGERTY, G.C.; HORNYCHOVA, M.; LAMMERS, J.; LARSEN, J.J.; MCDANIEL, K.L.; NELSON, B.K.; OSTERGAARD, G. 1997c. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: V. results of chemical testing. **Neurotoxicology** 18: 969-1056.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MOTA, L.M; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.A.; FRONZA, L.S.; BERTOLO, M.B. Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 51, n. 3, p. 199–219, 2011.

MUNGUÍA, Q. F. B. Mecanismos opioides que participan a nivel supraespinal el la potenciación del efecto anti-nociceptivo de la combinación tramadol + cafeína em el modelo de la formalina. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado) – **Universidad de Colima**, Facultad de Medicina, colima, 2007.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769-1777, 2007.

NAKAYAMA, G.R., CATON, M.C., NOVA, M.P., PARANDOOSH, Z., 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal Immunology Methods** 204, 205–208.

NEWALL, C.A; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J. D. Plantas Medicinaiis Guia para profissional de saúde. **Editorial Premier**, São Paulo 2002. p. VIII.

NWAEHUTOR, C. O.; EZEJA, M.I.; UDEH, N.E.; OKOYE, D.N.; UDEGBUNAM, R.I. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Mallotus oppositifolius* (Geisel) methanol leaf extracts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 805–810, 2014.

OECD. Test no. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: **OECD Publishing**, 2001.

OECD Organization for Economic Co-operation and Development. “Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)”. **OECD Guide 425**. 2008.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M.E.  $\beta$ -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 418, n. 1, p. 59-70, 2016.

OLIVEIRA, M. C. K. - "Remediação de solos contaminados por compostos orgânicos utilizando-se microemulsão", Tese de Doutorado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Brasil 2003.

OLIVEIRA, FS; SOUZA, DP; ALMEIDA, RN. Antinociceptive Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**.v. 31, n. 4, p. 588—591, 2008.

OLIVEIRA, C.C.; DE OLIVEIRA, C.V.; GRIGOLETTO, J.; RIBEIRO, L.R.; FUNCK, V.R.; GRAUNCKE, A.C., DE SOUZA, T.L.; SOUTO, N.S.; FURIAN, A.F.; MENEZES, I.R.; OLIVEIRA, M.S. Anticonvulsant activity of  $\beta$ -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**. v. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVER, S.J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **Journal of Rheumatology**., V.23, p. 56-60, 1996.

ORIÁ, R.B.; BRITO, G.A.C. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. **Blucher**, Paulo.2016.

ORIGONI, M.; MAGGIORE, U.L.R.; SALVATORE, S.; CANDIANI, M. Neurobiological mechanisms of pelvic pain. **BioMed Research International**. 2014.

OSSIPOV, M.H; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, 2010.

OSTERTAG, F., WEISS, J., MCCLEMENTS, D.J. Low-energy formation of ediblenanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phaseinversion. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 388, p. 95–112, 2012

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

PAIVA, L. A. F.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; **16o Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife, Brasil, 2000.

PAIVA, A.A.O.; CARDOSO, M. L.; BEZERRA, M. E. B.; CARVALHO, M. G. F.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, F. A.; LEITE, E. L. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1241-50, 2011.

PANT, A.; SAIKIA, S. K.; SHUKLA, V.; ASTHANA, J.; AKHOON, B.A.; PANDEY, R. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and

mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**. p. 81-95. 2014.

PAULA-FREIRE, L.I.; ANDERSEN, M.L.; GAMA, V.S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E.L. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**. v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

PELISSIER. T.; ALLOUI, A.; CAUSSADE, F.; DUBRAY, C. Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors: In vivo and in vitro evidence. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 278(1):8-14. August 1996.

PIERI, F.A.; SOUZA, M.C.; VERMELHO, L.L.; VERMELHO, M.L.; PERCIANO, P.G.; VARGAS, F. S.; BORGES, A.P.; DA VEIGA-JUNIOR, V.F.; MOREIRA, M.A. Use of  $\beta$ -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. **BMC Veterinary Research**. v. 12, n. 1, p. 216, 2016.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHAES, N. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.4, p.503-514, 2007.

PINHEIRO B, SILVA A, SOUZA G, FIGUEIREDO J, CUNHA F, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal Ethnopharmacology** v. 188, p. 479–486, 2011.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 44-56, 1998.

PINHO, J.P.; SILVA, A.S.; PINHEIRO, B.G; SOMBRA, I.; , BAYMA, J. C.; LAHLOU, S.; SOUSA, P.J.; MAGALHÃES, P.J. Antinociceptive and antispasmodic effects of the essential oil of *Ocimum micranthum*: potential anti-inflammatory properties. **Planta Médica**. v. 78, n. 7, p. 681-685, 2012.

PINI, L.A.; SANDRINI, M. ; VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **European Journal of Pharmacology** 308(1):31-40. August 1996.

POBER, J.S.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica V. 01, V.02, V. 03, : **Fundação Calouste Gulbenkian**, 1992.

PROELL, M.; RIEDL, S. J.; FRITZ, J. H.; ROJAS, A. M.; SCHWARZENBACHER, R. The nod-like receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. 2119, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAÚJO, A.A.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; QUINTANS, J.S.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; SILVA, G.F.; CARVALHO, F.M.; BROGDEN, N.K.; SLUKA, K.A.  $\beta$ -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Science**. 2016 Mar 15;149:34-41.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. **American Family Physician**, v. 76, n.7, p.1005-1012, 2007.

REÁTEGUI, J.L.P.; BARRALES, F.M.; REZENDE, C.A.; QUEIROGA, C.L.; MARTÍNEZ, J. Production of Copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches. **Industrial Crops & Products** 108 (2017) 128–139

REINSVOLD, R. E.; JINKERSON, R.E.; RADAKOVITS, R.; POSEWITZ, M.C.; BASU, C. The production of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene in a transgenic strain of the *Cyanobacterium synechocystis*. **Journal of Plant Physiology**. v. 168, n. 8, p. 848-852, 2011.

RIBEIRO, F.B.; MESTRINER, A.C.D.; FREITAS, O.; RAMOS, M.F.S.; MESTRINER JUNIOR, W. 2007. Estudo de toxicidade aguda da Oleoresina de copaíba e fração volátil. **15º Simpósio internacional de iniciação científica da USP**, Ribeirão Preto-SP.

RIBEIRO, B. P.; PEREIRA, W. S.; SOUSA, A. I. P.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Alteração no perfil bioquímico induzido por reação inflamatória granulomatosa em camundongos. **Revista de Ciências da Saúde**. v.12, n.1, p. 73-79, 2010.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O.; VEIGA JUNIOR, V.F., ANGELO DA CUNHA PINTO, A.C.; REGIANI, A. M. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v.8, n.2/3, p.851-861, maio-dez. 2004.

RIO, R. G.; WOISKY, D.O. Atividade anti-inflamatória, toxicidade e fitoquímica do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e de suas respectivas frações. 2001. Tese (Doutorado em Insumos Farmacêuticos) - **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RITNER, H.L.; MACHEL, S.K.A.; H.; STEIN, C. Immune system pain and analgesia. In: Basbaum, AI.; Bushnell., editors. **Science of Pain**. p. 407-427, 2009.

ROBBINS, S. L.; ANGELL, M.; KUMAN, V. Patologia básica. São Paulo: **Atheneu**, 1986.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005. 1592 p.



ROCHA, F.A.C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Evidence that peroxyinitrite affects human osteoblast proliferation and differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 434-442, 2002.

ROCHA, A. P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A.M.; GARCIA, J, B.S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v. 57, n. 1, 2007.

ROCHA, F.A.C.; LEITE, A.K.R.M.; POMPEU, M.M.L.; CUNHA, T.M. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. **Infection and immunity**. v. 76, n. 6, p.2736-45, 2008.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 3, p. 99–126, 2008.

RODRIGUEZ, A.J.R.; LAFOURCADE, P.A.; LOBATO, D.J.; KEITA, H.; RIVERO, S.H.; MACIEL, F.A.; HERNANDEZ, S.E.; TAVARES, C.J.C. Development, stability, and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 25, 1158–1168, 2017.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D.; Patologia. bases clínico patológicas da medicina. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

RUGGIERI, M; PASCUAL-CASTROVIEJO, I.; DI ROCCO, C. Neurocutaneous disorders phakomatoses and hamartoneoplastic syndromes. **Springer-Verlag/Wien**, Germany.2008.

RUH, A.C; FERNANDES, D.; ARTONI, R.F.; FAVERO, G.M. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização Publ. **UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.19, n.1, p. 11-19, 2013.

RUSSE, W.B.; SARVILLE D.A.; SCHOWALTER W.R.; Colloidal dispersions. **Cambridge University UK**, 1989.

SABULAL, B.; DAN, M. J. A.J.; KURUP, R.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**. v. 67, n.22, p. 2469-2473, 2006.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. 3, p.20–31, 2007.

SAIN, S.; NAOGHARE, P.K.; , DEVI, S.S.; DAIWILE, A.; KRISHNAMURTHI, K.; ARRIGO, P.; CHAKRABARTI, T. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agents against

lymphoma and neuroblastoma cells. **Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 13, n. 1, p. 45-55, 2014.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B.W.; Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair. Sorbitano monolaurate/ polyoxyethylene sorbitano monolaurate (Span 20/tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 252, p.27-32, 2003.

SANTOS, N.A.; MARTINS, N.M.; FERNANDES, L.S.; FERREIRA, R.S.; DE FREITAS, O.; SANTOS, A.C. The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neurogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. **Chemico-Biological Interactions**. p. 86-95, 2017.

SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; 2, RAIMUNDO GONÇALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, R.G.S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SAMUELSSON, G. Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy, 5 ed., Stockholm: **Swedish Pharmaceutical Press**, 2004.

SILVA, C.S. e CARVALHO, J.C.T. Inflamação. CARVALHO, J.C.T. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: **Tecmedd**, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: **Universidade/UFRGS/UFSC**, 2000.

SOLANS, C. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, n. 10, p. 102-110, 2005.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some central american plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 211-215, 2002.

SOUZA BARBOSA, P.C.; MOREIRA WIEDEMANN, L.S.; DA SILVA MEDEIROS, R., DE TARSO BARBOSA SAMPAIO, P.; VIEIRA, G. ; FLORÊNCIO DA VEIGA-JUNIOR, V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry & Biodiversity**. v. 1, n. 7, p. 1350-1360, 2013.

SOUZA, C.R.F.; GEORGETTI, R.; SALVADOR, M.J. FONSECA, M.I.V.; OLIVEIRA, W.P. Antioxidant activity and physical proprieties of spray a spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 45, 2009.

STEAGALL, P. V.; MOUTINHO, F.Q.; MANTOVANI, F.B.; PASSARELLI, D.; THOMASSIAN, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 115-20, 2009.

SUIJUN, W; ZHEN, Y.; YING, G.; YANFANG, W. A role for trans-caryophyllene in the moderation of insulin secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 444, n.4, p. 451-4, 2014.

SULAIMAN, M.R. HUSSAIN, M.K.; ZAKARIA, Z.A.; SOMCHIT, M.N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A.S.; ISRAF, D.A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7, p. 557-561, 2008.

SURH, Y. J. Oxidative stress, inflammation, and health. Packer L (ed.). London: **Taylor & Francis**, 2005.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, n. 3, p. 372-378, 2004.

SYED, I.B.; HOSAIN, F. Determination of LD<sub>50</sub> of barium chloride and allied agents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 22, p. 150-152, 1972.

TADROS, T. F.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and Stability of nanoemulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y. , TANAKA, S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. **Planta Médica**. v. 62, n. 5, p.469-470, 1996.

TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S.Y. The beta-glucan receptor, dectin -1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **Journal of Immunology**, v.169, p. 3876-3882, 2002.

TAVARES, J. P., MATINS, I.L; VIEIRA, A.S.; LIMA, F.A.V; BEZERRA, F. A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.16, n. 3, p. 350-356, 2006.

TEIXEIRA, T.F.; SOUZA, I. K. F.; ROCHA, R.D.R. *Helicobacter pylori*: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. **Percorso Acadêmico**, Belo Horizonte, v. 6, n. 12, 2016.

THOMSON, N. KOMAI-KOMA, M.; GRACIE, J.A.; WEI, X.Q.; XU, D.; MCINNES, I.B. Chemoattraction of human T cells by IL-18. **Journal of Immunology**, v.170, p. 1084-90, 2003.

TIMOTHY, J.; BROCKSOM, K.T.; DE OLIVEIRA; DESIDERÁ, A.L. The Chemistry of the Sesquiterpene Alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 933-942, 2017.

TJOLSEN, A; BERGE, O. G.; HUSKAAR, S.; et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p.5-17, 1992.

TOSO, R. S., SKLIAR, M. I. Histofisiopatologia y Tratamiento de la Ulcera Gastrica. Usos de Drogas Vegetales Anuario. **Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de lá Pampa**, 2000,

TUBARO, A. The croton oil ear test revisited. **Inflammation Research**. v. 17, n. 3. Pp-347349, 1986.

UENO, A. MATSUMOTO, H.; NARABA, H. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in ip-receptor-deficient mice. **Life Science**, v. 66, n. 12, p.155-160, 2000.

URGESI R, CIANCI R, RICCIONI ME. Update on triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*: current status of the art. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. v. 5, p. 151-157, 2012.

VALÉRIO, D.A.; CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOS, H.P.; DA COSTA, F.B.; PARADA, C.A; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI WA, JR. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**. v. 562, n. 1, p. 155-163, 2007.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11, 463–471

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, New Biology, v. 231, p. 232-235, 1971.

VEIGA, V. F, JR.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.

VEIGA VF, JR.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA VF, JR., ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L., PINTO, A.C.; CALIXTO, J.B.. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 58, n. 10, p.1405-1410, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils

from Copier clearness Huber ex Ducked, Copier reticulata Ducked and Copier multijugate Hayne--a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology** v.12, n. 2, p. 248-254, 2007.

VERMA PR, JOHARAPURKAR AA, CHATPALLIWAR VA, ASNANI A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 102, p. 298–301, 2005.

VOLANAKIS, J. E. Acute-phase proteins in rheumatic diseases. In: McCARTY, D. J.; KOOPMAN, W. J., eds. Arthritis and allied conditions. 12. ed. **Philadelphia, Lea & Febiger**, 1993.

VON MARTIUS, F.; BENTHAM; Flora Brasiliensis v. 15, n. 240, 1870.

XAVIER-JUNIOR, F.H.; MACIUK, A.; MORAIS, A.R.V.; ALENCAR, E.N.; GARCIA, V.L.; EGITO, E.S.T.; VAUTHIER, C. Development of a Gas Chromatography Method for the Analysis of Copaiba Oil. **Journal of Chromatographic Science**, Volume 55, Issue 10, November-December 2017, Páginas 969–978.

YAMAOKA Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Natural Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 7, p. 629-641, 2010.

YASOJIMA, E.Y.; TEIXEIRA, RK, HOUAT, A.D.E.P.; COSTA, F.L.; SILVEIRA, E.L.; BRITO, M.V.; LOPES FILHO, G. DE J. Effect of copaiba oil on correction of abdominal wall defect treated with the use of polypropylene/polyglycaprone mesh. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.28, n. 2, p. 131-135, 2013.

WATANABE, C.H.; NOSSE, T.M.; GARCIA, C.A.; PINHEIRO POVH, N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4. P. 76-86, 2006.

WERNER, D. Onde não há médico. 15ª Ed., **Editora Paulos**, São Paulo, p. 28, 1994.

WHITTLE BA. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Journal of Neuropharmacology** v. 3, p. 369 – 378, 1964.

WILLIAMSON, E.M. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. **Wiley & Sons Ltd.**: Chinch ester, 1996.

WILLIS, J. C. A Dictionary of flowering plants and ferns. 8th ed., **Cambridge Press**: Great Britain, 1973.

WILLMENT, J. A.; LIN, H.H.; REID, D.M. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone and lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**., v.171, p. 4569-4573, 2003.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WILLOUGHBY, D.A. In vivo models of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 109-113, 2003.

WILSON, A.W.; MEDHURST, S.J.; DIXON, C.I.; BONTOFT, N.C.; WINYARD, L.A.; BRACKENBOROUGH, K.T.; DE ALBA, J.; CLARKE, C.J.; GUNTHORPE, M.J.; HICKS, G.A.; BOUNTRA, C.; MCQUEEN, D.S.; CHESSELL, I.P. An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. **European Journal of Pain**. v. 10, n. 6, p. 537-49, 2006.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WONG, H.L.; BRENDAYAN, R.; RAUTH, AM.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v.59, 2007.

WONG, H.L., CHATTOPADHYAY, N., WU, X.Y., BENDAYAN, R.; Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **ADV Drug Delivery Review**. 2010, 62(4), 503.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine Strategy 2002-2005. **Geneva**, 2002.

ZHANG, L.; QUE, G. Influence of the HLB parameter of surfactants on the dispersion properties of brine in residue. **Colloids and Surfaces A; Physicochemical and Engineering Aspects**, v, 320, p. 111-114, 2008.

ZORZIA, G.K.; CARVALHO, E.L.S.; VON POSERA, G.L.; HELDER FERREIRA TEIXEIRA, H.F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 25 (2015) 426–436

## ANEXOS

### ANEXO 1



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A16D06E**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A16D06E
Usuário:	Universidade Federal do Amazonas
CPF/CNPJ:	04.378.626/0001-97
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

#### Espécie

Copaifera multijuga  
Óleo resina de copalba

#### Fonte do CTA

CTA de origem identificável diretamente com provedor

#### Provedor

Comunidade Indígena Dessano

Título da Atividade:	AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO ÓLEO DE COPAIBA DESTILADO (Copaifera sp) E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS
----------------------	--

#### Equipe

EMERSON SILVA LIMA	Universidade Federal do Amazonas
EVANDRO DE ARAÚJO SILVA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

## ANEXO 2



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Comissão de Ética no Uso de Animais




## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação química e farmacológica do óleo de cabaíba destilado (*Copaifera spp*) e aplicações biotecnológicas.”, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Evandro de Araújo Silva** e **Emerson Silva Lima** (docente/UFAM), que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada sob o número 039/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Outubro/2018 à Março/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos ( <i>Mus musculus</i> , Swiss Webster)
N. de animais	84 animais
Peso/idade	20 gramas / 28 dias
Sexo	Machos
Origem	Setor de avicultura da FCA/ UFAM

Manaus, 01 de outubro de 2018.

  
Profª. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira  
Presidente do CEUA-UFAM



## ANEXO 3



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 009235 1

**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 04378626000197

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. General Rodrigo Otávio, 3000 - Campus Universitário, Bairro

Japim

Cidade: Manaus

Estado: AM

CEP: 69077-000

País: Brasil

Telefone: (92)3305-1758

Fax:

Email: depi\_protect@ufam.edu.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/05/2019 às 17:56, Petição 670190042709

