



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS DO USO TÓPICO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera spp.*) EM MODELO MURINO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA

Mestrando: Gustavo Coelho Andrade

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

Coorientadora: Profa. Dra. Cecilia Verônica Nunez

MANAUS – AM

2022

GUSTAVO COELHO ANDRADE

EFEITOS DO USO TÓPICO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera spp.*) EM MODELO MURINO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa (UFAM)

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes (UFAM)

Coorientadora: Profa. Dra. Cecilia Verônica Nunez (INPA)

MANAUS – AM

2022

Ficha Catalográfica

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

A553e Andrade, Gustavo Coelho
Efeitos do uso tópico do óleo de copaíba (copaifera spp.) em modelo murino inflamatório induzido por carragenina / Gustavo Coelho Andrade . 2022
59 f.: 31 cm.

Orientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Coorientador: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientadora: Cecilia Verônica Nunez
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleo de copaíba. 2. Articulação tíbio-tarsal. 3. Inflamação. 4. Citocinas. 5. Edema. I. Costa, Oscar Tadeu Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me ajudou nessa jornada, que me deu forças para vencer cada etapa nesses anos de Mestrado. Dedico também este trabalho a minha família e amigos que sempre me deram apoio nesse processo e me ajudaram a realizar mais uma conquista na minha vida. E dedico este trabalho a toda a equipe do Laboratório de Morfologia Quantitativa, membros atuais e antigos, que ajudaram significativamente na construção do meu conhecimento em Imunologia, na experimentação do projeto e na realização desse e de outros importantes trabalhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha mãe **Izabel Marinha Pinheiro Coelho** por ser minha mentora, auxiliadora, amiga e uma mãe excepcional que não mede esforços diariamente para melhorar a vida dos seus filhos.

A minha avó **Aldair Pinheiro Coelho** que procura ajudar de todas as formas possíveis a construir o meu desenvolvimento em todas as áreas da minha vida, sendo uma das pessoas que mais me inspira nessa caminhada.

Ao meu orientador prof. Dr. **Oscar Tadeu Ferreira da Costa** que nesses mais de 3 anos de pesquisa científica se tornou mais que um mestre e tutor, me auxiliando a construir a minha carreira profissional e no meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu coorientador prof. Dr. **Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes** pelo apoio científico, instrução e parceria na elaboração desse projeto.

À minha coorientadora profa. Dra. **Cecília Verônica Nunez** que nos ajudou muito para que o experimento fosse realizado, nos auxiliando com a parte burocrática e com seus conhecimentos na área. Obrigado pela paciência e colaboração nesse período.

À doutora **Vanda Santana Dini**, que foi uma mentora e uma mãe acadêmica para mim em todos esses anos de graduação e pós-graduação. Agradeço a paciência, ajuda e pelos conselhos, vou ser sempre grato a você por esses anos trabalhando juntos.

Agradeço ao mestrando **Pedro Victor Monteiro de Lima** que sempre foi um parceiro de trincheira nessa jornada desde a graduação, ajudando em todas as etapas do projeto, sendo um amigo e um parceiro profissional. Muito obrigado, meu querido.

A todos do **Laboratório de Morfologia Quantitativa**, que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto e para o meu crescimento profissional e pessoal. Especialmente a técnica **Lene Carmo**, ao doutorando **Lucas Castanhola** e doutoranda **Nadyelle Castro**.

Ao **Biotério Central de Experimentação Animal (INPA)**, e a todos os técnicos que nos ajudaram grandemente na realização do experimento.

A todo o corpo docente, discente e administrativo do **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA**. Agradecimento especial ao Édson, Dra. Jerusa e Dr. Alysson que ajudam na organização, administração e crescimento do programa.

A **FAPEAM** pela bolsa de estudos, que foi importante para dedicação exclusiva à pesquisa.

Aos **animais do biotério**, o meu respeito porque deram suas vidas a pesquisa.

Por fim, agradeço a **todos** que de alguma forma ajudaram para realização deste trabalho.
Agradecido!

“Considero que os nossos sofrimentos atuais não podem ser comparados com a glória que em nós será revelada”.

Romanos 8:18

RESUMO

O uso tópico do óleo de copaíba faz parte da medicina popular dos povos amazônicos. Sua resina é tida como anti-inflamatória dentre outras funções. Contudo, estudos adicionais são necessários para comprovar seu papel terapêutico. Mais precisamente, uma abordagem sobre o perfil de células imunes e citocinas envolvidas em inflamação aguda diretamente nas articulações. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação tópica do óleo de copaíba nas articulações tibiotarsais de camundongos Balb/c. Para tal, os animais foram divididos em quatro grupos (n=6): Salina, Carrag 1%, Diclo e Cop e induzidos a inflamação por Carragenina (exceto Salina) por 5 horas, sendo que a copaíba foi aplicada topicamente na pata esquerda dos animais (Cop) 3 horas antes do final do experimento. Medidas de espessura de pata e coletas de sangue (leucograma e níveis de citocinas) foram os parâmetros usados para avaliar este estudo. Em conclusão, a aplicação tópica da copaíba teve um efeito anti-edematogênico, inibiu a leucocitose e a linfocitose, reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF e IL-17A e aumentou o nível da citocina anti-inflamatória IL-10. As principais características da inflamação por Carragenina foram patas edematosas/leucocitose/linfocitose e níveis elevados de TNF/ IFN- γ . Os resultados promissores obtidos neste estudo reforçam o papel anti-inflamatório do uso da copaíba tópica no tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: óleo de copaíba, articulação túbio-tarsal, inflamação, citocinas, edema, hematologia, citocinas.

ABSTRACT

Topical use of copaiba oil is part of the popular medicine of Amazonian peoples. Its resin is considered anti-inflammatory among other functions. However, additional studies are needed to prove its herbal role. More precisely, an approach on the profile of immune cells and cytokines involved in acute inflammation directly in the joints. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of topical application of copaiba oil on the tibiotarsal joints of Balb/c mice. For this, the animals were divided into four groups (n=6): Saline, Carrag 1%, Diclo and Cop and induced inflammation by Carrageenan (except Saline) for 5 hours, with copaiba being topically applied to the left paw of the animals (Cop) 3 hours before the end of the experiment. Paw thickness measurements and blood collections (leukogram and cytokine levels) were the parameters used to evaluate this study. In conclusion, topical application of copaiba had an anti-edematogenic effect, inhibited leukocytosis and lymphocytosis, reduced the levels of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF and IL-17A, and increased the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The main features of carrageenan inflammation were edematous paws/leukocytosis/lymphocytosis and elevated levels of TNF/IFN- γ . The promising results obtained in this study reinforce the anti-inflammatory role of topical copaiba use in the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: copaiba oil, tibiotarsal joint, inflammation, cytokines, edema, hematology, cytokines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. Óleo de copaíba.....	11
2.2. Modelos experimentais inflamatórios.....	16
2.3. Prevenção e tratamento de manifestações articulares	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo geral	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. Animais experimentais	28
5.2. Indução da inflamação	28
5.3. Óleo de copaíba.....	29
5.4. Delineamento experimental.....	30
5.5. Análise de edema nas articulações.....	31
5.6. Coleta de sangue e eutanasia	32
5.7. Hematologia	32
5.8. Determinação das concentrações de citocinas.....	33
5.9. Análise estatística	34
6. RESULTADOS	35
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÃO	50
9. REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

O óleo de copaíba é um óleo-resina extraído das árvores copaibeiras, que há muitos anos é utilizado no tratamento de diversas enfermidades. O tratamento pode ser realizado através da sua ingestão oral ou a aplicação do produto in natura ou em pomadas, tendo seu uso bastante conhecido na população brasileira e ao redor do mundo (Pieri et al., 2009).

O óleo-resina possui diversas propriedades medicinais, e esses efeitos têm relação com a própria capacidade da árvore de se defender contra invasores microbicidas. O seu potencial anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, antimicrobiano, antifúngico e antinociceptivo já foi evidenciado (do Carmo Silva et al., 2019; Santos et al., 2008; Gomes et al., 2007; Paiva et al., 2002). E esses resultados favorecem o interesse de pesquisadores para a utilização desse óleo no tratamento de outras doenças.

Foi comprovado em estudos que a utilização do óleo de copaíba oral ou tópico pode reduzir o edema de pata de camundongos inflamados, diminuindo o infiltrado leucocitário, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade de outros mediadores químicos inflamatórios (Castro Ghizoni et al., 2017; Dias et al., 2014; Lucca et al., 2018). Esses dados trazem perspectivas positivas na utilização desse produto em processos inflamatórios agudos e crônicos.

Nesse contexto, pesquisas em doenças e distúrbios inflamatórios constantemente utilizam modelos animais para a indução de inflamação em patas, com o intuito de avaliar a dinâmica do sistema imunológico, a resposta imune contra determinados antígenos imunogênicos e os danos causados por esses antígenos ao tecido inflamado (Guay et al., 2004).

A carragenina, um polissacarídeo retirado da parede celular de algas vermelhas comestíveis, vem sendo utilizada como um modelo experimental de edema de pata em ratos e camundongos (Amdekar et al., 2012; Ou et al., 2019; Thomson & Fowler, 1981). Várias pesquisas realizaram seus experimentos com a carragenina, pois em poucas horas após a administração intraplantar, já é notável o edema de pata, além de ser um modelo experimental reproduzível (Annamalai & Thangam, 2017; Guay et al., 2004; Posadas et al., 2004).

A carragenina é identificada por células sentinelas localizadas nos tecidos, que rapidamente liberam citocinas e quimiocinas responsáveis por recrutar leucócitos para a região tecidual. Com a entrada dessas células há a liberação de mediadores citotóxicos e a fagocitose desses polissacarídeos, uma tentativa do sistema imune de neutralizar e eliminar esse corpo estranho (Necas & Bartosikova, 2013).

Estudos demonstram que a indução da carragenina em patas de camundongos podem favorecer a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- γ , responsáveis por aumentar a capacidade de atuação de neutrófilos e macrófagos e de ativação de outros mecanismos imunes. Esses mediadores promovem um processo inflamatório agudo, que se não resolvido, pode evoluir para um distúrbio inflamatório crônico (Annamalai & Thangam, 2017).

Sabe-se que doenças inflamatórias como a Artrite Reumatoide (AR) é caracterizada por uma inflamação prolongada na região das articulações, esse estado biológico é desenvolvido devido uma falha nos mecanismos de resolução da inflamação e tolerância autoimune. A AR atinge cerca de 1% da população mundial e é uma doença progressiva e sem cura atualmente, que pode incapacitar o paciente ao longo do tempo (Smolen et al., 2018).

Estudos utilizando a carragenina como modelo de indução de artrite já foram realizados, e evidenciaram uma patogênese capaz de simular o que acontece na doença autoimune (Bao et al., 2018). Esses estudos foram essenciais para a mudança de direcionamento nas pesquisas e hoje em dia favorecem a continuação da busca por tratamentos mais eficazes para essa doença.

Pois, apesar dos avanços no tratamento da AR, com inibidores de atividade do sistema imune, esses medicamentos ainda não trazem a cura, somente a diminuição dos danos e a remissão da doença a longo prazo. Além disso, alguns medicamentos podem trazer efeitos colaterais sistêmicos e muito prejudiciais aos pacientes (Faleiro et al., 2011; Smolen et al., 2018).

Nessa conjuntura, sabe-se que a carragenina tem a capacidade de ativar o sistema imune e promover uma inflamação em poucas horas e o óleo de copaíba, aplicado oral e topicamente, já foi eficiente na remissão do edema de pata nesses experimentos, mas ainda há a necessidade de entender essa dinâmica dos mediadores inflamatórios para caracterizar melhor esse evento (Carvalho et al., 2005; Junior et al., 2007).

Por isso, em nosso estudo, nós utilizamos o óleo de copaíba (copaíba spp.) aplicado topicamente em patas de camundongos induzidos a inflamação por carragenina, com o objetivo de avaliar o potencial anti-inflamatório do óleo-resina.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Óleo de copaíba

O óleo de copaíba é extraído de uma árvore que tem seu nome conhecido popularmente como “copaíba”, “copaibeiras”, “pau d’ óleo”, “copaúva”, “copaibarana”, “bálsamo”, “marimari” dentre outros. O nome “copaíba” vem do tupi Kupa’ iwa, que significa “árvore de depósito” e refere-se ao fato de que essa árvore armazena um óleo-resina em abundância.

As copaibeiras são plantas da família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e do gênero *Copaifera* L. Estão presentes na América Latina e nas regiões da África Ocidental, sendo encontradas no Brasil nas regiões Amazônica, Centro-Oeste e Sudeste. Chegam a viver 400 anos e possuem mais de 72 espécies catalogadas, onde 16 são encontradas no Brasil (PIERI et. al. 2009).

Na maioria das espécies, são árvores de grande porte com seu tronco possuindo um diâmetro de até 4 metros, podendo chegar a 40 metros de altura. É uma planta que possui uma casca aromática, com folhagem densa, alternada, peciolada e penulada. As flores são pequenas, arranjadas em panículos axilares e hermafroditas, e aparecem, geralmente, entre outubro e julho. Seus frutos costumam aparecer entre julho e outubro, são do tipo vagem seca com sementes pretas ovóides e com um arilo amarelo rico em lipídeos (Alencar, 1982; Van Den Berg, 1982; Lorenzi, 1992; Xena & Berry, 1998).

As características da planta começam a ser notadas a partir do seu 5º ano de vida, sua identificação botânica é difícil e é geralmente realizada através da análise de

suas flores, pubescência das sépalas, comprimento dos anteros e a condição glabrosa ou não glabrosa do pistilo (MARTINS-DA-SILVA et. al., 2007).

A copaibeira possui em seu interior grande quantidade de um óleo-resina chamado óleo de copaíba, possuindo uma parte resinosa (55-60% do óleo) formada por ácidos diterpenos, e uma parte oleosa composta principalmente por sesquiterpenos. O óleo pode ser extraído de diversas maneiras, métodos passados de geração em geração, mas que muitas vezes pode ser prejudicial à planta (Garcia and Yamaguchi 2012).

A extração pode ser realizada através de um corte em “V” no tronco com o uso de um machado e coletar o óleo derramado e concentrado no local da incisão. Ou pode ser feita a derrubada completa da árvore, extraíndo o óleo do seu interior e posteriormente utilizando o tronco da árvore para diversos fins comerciais. Ambos os métodos são muito agressivos e levam a morte das árvores (Leite et al., 2001; Shanley et al., 2005). Essas práticas vêm sendo combatidas cada vez mais por órgãos de fiscalização ou de pesquisas e o manejo sustentável vem ganhando espaço nas fazendas extrativistas.

O manejo sustentável consiste em utilizar um trado para abertura de furos no tronco da árvore, inserção de um tubo de PVC até a metade do diâmetro do tronco e utilização de vasilhas para a coleta do óleo, coletando uma quantidade apenas nas primeiras 24 horas. Os furos são fechados, posteriormente, com pedaços de madeira ou com tampas roscas. Além desse processo, para que uma árvore esteja apta para sofrer a incisão, são necessárias a análise e coleta de alguns dados, como: Diâmetro a Altura do peito (DAP) (que deve ser superior a 40 cm), mapeamento da árvore com o uso de bússulas e passos calibrados e o intervalo de tempo da última extração (não pode ser coletada uma amostra com menos de 3 anos de intervalo) (Leite et al., 2001; IMAFLORA, 2004).

A quantidade varia muito entre as espécies, depende do período do ano e pode ser que seja maior na primeira ou na segunda extração, contudo, esses dados ainda são inconclusivos. Sabe-se que algumas espécies não sofrem alteração na composição química do seu óleo dependendo do estado pluviométrico, porém em períodos mais chuvosos é notável o aumento na quantidade (MEDEIROS, 2006). Há uma série de esforços tanto de pesquisadores, quanto dos produtores, para que seja elucidado qual o manejo certo para se obter a maior quantidade de óleo de copaíba.

O óleo de copaíba é um produto de excreção ou de desintoxicação da planta que tem como objetivo promover a defesa contra animais, fungos e bactérias. Essas propriedades foram observadas há mais de 500 anos, supondo que alguns animais feridos buscavam passar os ferimentos no tronco da árvore para serem cicatrizados, assim os povos nativos começaram a utilizar o óleo como tratamento medicinal contra doenças e para sarar o coto umbilical dos recém-nascidos (ROMERO, 2007 Maciel et al., 2002; Veiga Junior & Pinto, 2002; Francisco, 2005).

A copaibeira pode ser utilizada para fins de construção civil e naval e para fabricação de carvão, já o óleo é comumente utilizado na produção de perfumes e cosméticos (sabonetes, xampus e cremes). Contudo, a utilização mais popular e que está em constante desenvolvimento, é a aplicação ou ingestão do óleo para o uso medicinal (Veiga Junior & Pinto, 2002; Cascon, 2004).

O óleo de copaíba possui uma coloração que varia de amarelo ouro a marrom, de acordo com a espécie e é constituído por dois grupos de substâncias distintas solúveis entre si, uma parte sólida resinosa e não volátil composta por ácidos diterpênicos, compreendendo 40% do óleo, e a outra composta por sesquiterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos) completando os 60% restantes (Cascon and Gilbert 2000). Os principais diterpenos são o ácido hardwickico, colavenol, ácido copaífero, ácido

copaiferólico, ácido calavenico, ácido copálico (biomarcador de óleos de copaíba) entre outros. Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo de copaíba são o β -cariophileno (15 a 40%) (com destaque pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngica e antiedematogênica), o β -bisabolueno (com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas), o α -humuleno e β -selineno entre outros (Junior and Pinto 2002).

Seu uso foi difundido pelos colonizadores por todo mundo, viajantes e médicos, começaram a utilizar óleo como analgésico e cicatrizante e em meados do século XVI o óleo de copaíba já era considerado um dos produtos mais exportados pelas províncias do Maranhão e Grão-Pará (Alencastro, 2000; Gurgel, 2004).

O uso medicinal do óleo de copaíba foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), órgão americano de fiscalização, em 1972, após testes de sensibilização e irritação em 25 voluntários. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o uso de produtos naturais (produtos de extração vegetal), e de acordo com Relação nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) o óleo de copaíba é um produto natural (copaíba spp.) apto para o uso medicinal no SUS.

Assim, inúmeras pesquisas já vinham e vêm sendo realizadas demonstrando as propriedades medicinais do óleo de copaíba, como: ação cicatrizante, antisséptica, antitumoral, antibacteriano, expectorante, diurético, analgésico, antiviral, antidiarreica, ação contra leishmaniose e picada de cobra, anti-inflamatória, antifúngica e inúmeras outras (Veiga Junior & Pinto, 2002; Oliveira et al., 2005; Veiga Junior et al., 2005; Ramos, 2006)

Um estudo de Basile et al. (1988) baseado em uma experimentação em camundongos induzidos a inflamação aguda por carragenina injetada nas patas, analisou o potencial anti-inflamatório do óleo de copaíba, onde foi observada uma inibição satisfatória de 13% a 47% do edema de pata.

Junior et al. (2007) analisaram a atividade anti-inflamatória de três diferentes óleo-resinas de copaíba (*C. multijuga* Hayne, *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke) em um modelo de pleurisia induzida por zymosan, onde foi demonstrado que os óleos-resina foram capazes de inibir ($p < 0,05$) a produção de NO pelos macrófagos murinos *in vivo*, além de reduzir em 45% o número total de leucócitos e inibir o acúmulo de neutrófilos em 73% na dose de 100mg/kg, administrada oralmente.

O óleo de copaíba também se mostrou eficaz na inibição do NO e da infiltração de neutrófilos, tanto em aplicação subcutânea quanto por gavagem, em camundongos submetidos à sepse em um estudo experimental randomizado (NM Botelho, 2014).

FB Teixeira et. al. (2017) induziram lesões em línguas de rato, e constataram que, após o tratamento oral por gavagem de 10% de óleo de copaíba, os animais tratados tiveram um menor infiltrado inflamatório crônico ($1,2 \pm 0,20$) e menor intensidade do edema ($1,8 \pm 0,20$) (mas não foi uma diferença estatisticamente significativa), em relação ao grupo controle ($2,0 \pm 0,0$) e ($2,4 \pm 0,24$) respectivamente.

Além desses, pesquisadores buscaram identificar o potencial anti-inflamatório de uma nanoemulsão de óleo de copaíba (200mg/kg com 20% de óleo de copaíba) em um modelo de inflamação por injeção de ácido araquidônico (2 mg/orelha (10 uL) em orelhas de camundongos. Após 1h foi analisado o edema na orelha direita e a

nanoemulsão foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0.05$) o edema de orelha em comparação com o controle negativo (Letícia Lucca, 2017).

Esses dados trazem uma perspectiva positiva, baseada em evidências do papel do óleo de copaíba, seja administrado por tópica, oral, subcutânea dentre outros. A atividade anti-inflamatória e antiedematogênica do óleo foi capaz de reduzir a inflamação em diversos modelos experimentais, como relatado acima, comprovando que seu uso pode indicar um tratamento em conjunto com outros fármacos ou alternativo para inflamações articulares.

2.2 Modelos experimentais inflamatórios

O óleo de copaíba vem sendo empregado na medicina tradicional há muitos anos, sendo usado muitas das vezes de modo empírico pela população (Leandro et al. 2012). Nas últimas décadas, vários projetos se dedicaram ao estudo das propriedades físico-químicas do óleo no corpo humano, buscando justificar os efeitos farmacológicos observados na população. Assim, diversos modelos experimentais inflamatórios foram utilizados para buscar induzir uma inflamação local e/ou generalizada em modelos animais utilizando o óleo de copaíba como tratamento (Ferro et al. 2018).

Dentre esses modelos experimentais podemos destacar o Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que gera uma resposta inflamatória por meio de receptores do tipo Toll 4 (TRL4) (Takeda, Kaisho, and Akira 2003). A injeção intraplantar de LPS induz uma hiperalgesia inflamatória mecânica, pois ativa algumas vias de sinalização como NF- κ B e MyD88, que são

responsáveis pela produção e liberação de TNF- α , IL-1 β e IFN-1, citocinas que aumentam o recrutamento e a ativação de células (Calil et al. 2014).

Em um estudo recente das propriedades anti-inflamatórias de *C. reticulata* e *C. langsdorffii*, 11 dos seus principais componentes incluíram o β -cariofileno (56,1%), γ -elemeno (12,6%), α -humuleno (6,4%) e α -copaeno (3,7%). O estudo mostrou que o óleo de copaíba foi capaz de reduzir a produção de NO ($P < 0,01$) mas não a produção de prostaglandina E2 induzida por LPS. Contudo a copaíba suprimiu as citocinas pró-inflamatórias interleucinas (IL) 6, IL-8 e IL-1 β em células expostas ao LPS (Amilia Destryana et al. 2014).

A inflamação induzida por LPS dura algumas horas, atingindo um pico máximo de 5h de liberação das principais citocinas, assim como aumento da atividade da mieloperoxidase, marcador indireto da contagem de neutrófilos e macrófagos nos tecidos (Calil et al. 2014). Apesar de ser um modelo utilizado em perfis inflamatórios, o seu uso é consolidado na literatura quando se quer estudar mecanismos imunológicos associados a patógenos e o potencial de fármacos antimicrobianos (Chiu et al. 2013).

Outro modelo experimental inflamatório utilizado é o Adjuvante completo de Freund (CFA), associado a bacilos de tuberculose mortos, um modelo utilizado há muitos anos para induzir uma inflamação local mais prolongada (3 a até 30 dias) (Pearson 1956).

Nesse contexto, um estudo buscou identificar o papel do β -cariofileno (um dos principais constituintes do óleo de copaíba) em uma inflamação induzida por Adjuvante de Freund 0,1mL (500 μ g) nas patas esquerdas de ratos Holtzman saudáveis. O β -cariofileno na dose de 430 mg·kg⁻¹ administrado oralmente por 18 dias, foi capaz de reduzir o edema de pata, os inchaços nos gânglios linfáticos e o número de leucócitos

circulantes e articulares, demonstrando um potencial anti-inflamatório e antioxidante desse composto (Ames-Sibin et al. 2018).

Contudo, há poucos estudos que correlacionam o potencial do óleo de copaíba em modelos murinos experimentais que induziram uma inflamação com a administração de CFA. Sabemos que o β -cariofileno é um dos compostos mais importantes da copaíba, mas é necessário um estudo que demonstre os efeitos do uso tópico em manifestações inflamatórias em articulações.

Nesse contexto, modelos experimentais de artrite têm sido utilizados vastamente em estudos para verificar a fisiopatologia da Artrite Reumatoide (AR). Apesar da complexidade da patogênese da inflamação, nota-se o constante avanço da pesquisa em relação à doença. Dentre os modelos usados o Zymozan A (Zy A) teve seu primeiro estudo voltado para a AR em 1977, e cada vez mais vem sendo usados em modelos experimentais devido ao seu potencial inflamatório, que induz uma ação rápida e local (Rocha et al., 2003)

O Zy A é um polissacarídeo da parede celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Ele tem a capacidade de se ligar a receptores TLR2 nos macrófagos e levar a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a respostas imunes inatas e adaptativas (Frasnelli et al., 2005). Além disso, promove a ativação do sistema complemento pela via alternativa, que pode amplificar a resposta inflamatória (Cruvinel et al., 2010). A indução intramuscular do Zy A em joelhos comumente promove uma infiltração de células polimórficas nucleares, há uma hipertrofia da membrana sinovial e formação do Pannus, que podem gerar danos na cartilagem. O edema na articulação é um sinal que é desenvolvido nas primeiras 6 horas da indução, e após 7 dias há uma diminuição significativa do seu volume (Fearon & Austen, 1977), porém estudo de

Frasnelli et al. (2005) mostrou que a inflamação pode perdurar por até 25 dias após a indução.

Veiga et al. (Junior et al. 2007), buscaram avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba de determinadas espécies (*C. multijuga* Hayne, *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke) em diferentes doses (100, 200 e 400mg/kg) em um modelo de pleurisia induzido por zymosan (100µg/cavidade) em camundongos. Após 4 horas, o óleo de copaíba na dose de 100mg/Kg inibiu o acúmulo de leucócitos no tecido (45%) e inibiu o acúmulo especificamente de neutrófilos nas três doses utilizadas (100 mg/kg, 73%; 200 mg/kg, 49% e 400 mg/kg, 57%). Esses efeitos demonstram o papel do óleo de copa na redução da inflamação em modelos murinos de forma sistêmica, contudo ainda carecem estudos sobre a potencial do óleo em uma inflamação local em articulações.

Dentre os modelos usados, a Carragenina é a que mais se tem evidência científica de estudos direcionados a avaliar o papel anti-inflamatório da copaíba. A carragenina é um polissacarídeo proveniente das paredes celulares de algas vermelhas comestíveis, da classe Rhodophyceae, e espécie *Chondrus crispus*. Essas algas são originárias do oceano Atlântico que permeia a América do Norte, Inglaterra e Europa. É um produto usado tanto na indústria alimentícia quanto pela indústria farmacêutica pelas suas propriedades gelificantes, espessantes e emulsificantes (Necas and Bartosikova 2013).

A sua estrutura química é composta por unidades alternadas de d-galactose e anidro-galactose (3,6-AG) unidas por ligações glicosídicas e conjugadas a um grupo sulfato. É um polissacarídeo classificado em 5 subunidade (λ , κ , ι , ϵ , μ), e as suas propriedades são diferenciadas de acordo com o número e a posição de grupos sulfato e 3,6-AG na estrutura química (Necas and Bartosikova 2013).

A carragenina é usada amplamente para estudar e avaliar o processo inflamatório bem como os efeitos de drogas anti-inflamatórias, já que pode promover uma inflamação local em poucas horas após a sua administração local. Nesses estudos foi utilizada a carragenina em uma concentração de 1 a 3% e realizada uma injeção intraplantar em doses de 50µL a 150µL (Necas & Bartosikova, 2013).

Assim que a carragenina é injeta no tecido, pode ser identificada como um corpo estranho, e o sistema imunológico é ativado e inicia-se um processo inflamatório para gerar a neutralização e eliminação desse polissacarídeo. Inicialmente, na fase aguda da inflamação é caracterizado um aumento da permeabilidade vascular causada por histaminas, bradicininas e prostaglandinas que promovem o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação (Cuzzocrea et al., 1999; Guay et al., 2004).

Nesse contexto, o VEGF, um fator de crescimento angiogênico, parece ser uma potente citocina pró-inflamatória, que eleva a infiltração leucocitária mediada pelo aumento da proteína de adesão ICAM-1. e a interação dos leucócitos com ICAM-1 parece ser necessária para a indução ou aumento da inflamação (Dalmarco et al., 2012; Da Silva Buss et al., 2012; Ferrara et al., 2003; Ghadrhan et al., 2016).

Notadamente, neutrófilos são recrutados e ativados promovendo a fagocitose de alguns produtos da carragenina e produzindo radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (Salvemini et al. 1996; Posadas et al. 2004). Outro importante produto secretado pelos neutrófilos e outras células ativadas (macrófagos, células endoteliais e células nervosas sensoriais) é o NO, que contribui para lesão tecidual, hiperalgesia e desenvolvimento do edema de pata (Handy e Moore 1998; Omote et al. 2001).

Em um estudo que avaliou a inflamação produzida pela carragenina em modelo de edema de pata, mostrou que em poucas horas após a indução os níveis de mieloperoxidase (MPO) estavam significativamente elevados, lembrando que a MPO é um potente marcador da atividade dos neutrófilos (Posadas et al., 2004). Também é importante salientar o papel da imunidade humoral nessa fase inicial da inflamação, destacando um estudo que demonstrou que as moléculas de Imunoglobulinas M (IgM) foram capazes de se ligar a carragenina mais sensivelmente do que outras Ig, validando um papel crucial na opsonização dessas moléculas e ativação do sistema completo (Sokolova et al., 2021)

Além disso, um dos mecanismos que favorecem o sucesso do processo inflamatório é a atividade das citocinas pró-inflamatórias, e em um estudo foi demonstrado que em 4 horas após a injeção da carragenina já foi possível identificar uma coloração positiva de TNF, IL-6 e IL-1 β em células imunes (fibroblastos, neutrófilos, macrófagos) em cortes histológicos de pata de ratos (Vazquez et al., 2015). Em concordância com esses achados, outros estudos evidenciaram que houve um aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 após a indução da carragenina, e essas citocinas favoreceram uma maior sensibilidade a dor, migração de leucócitos e formação de edema em ratos (Annamalai & Thangam, 2017; Cunha et al., 2005).

Curiosamente, Vazquez et al. Também demonstraram que o edema de pata induzido por carragenina, em fase aguda, tem implicações sistêmicas caracterizadas pelo aumento do nível de proteínas de fase aguda e respostas inflamatórias pulmonares, incluindo edema pulmonar, deposição de fibrina e infiltração de leucócitos (Vazquez et al., 2015).

JCT Carvalhos et al. (Carvalho et al. 2005) procuraram entender qual o papel anti-inflamatório e analgésico do óleo bruto de copaíba no edema de pata induzido por

carragenina (1000 µg/paw) em ratos. Cerca de 52%, 58% e 62% do edema foi reduzido após a aplicação tópica do óleo nas doses de 517 mg/kg, 1035 mg/kg and 1802 mg/kg, respectivamente, demonstrando um efeito benéfico nas primeiras 4 horas.

Já outros autores analisaram a composição e o efeito farmacológico de 8 óleos de copaíba adquiridos em alguns estados do Brasil. Eles buscaram entender quais são as propriedades químicas em comum entre as amostras que poderiam ter efeito anti-inflamatório em um modelo de edema de pata induzido por carragenina (300 µg/pata). Das 8 amostras, 3 tiveram êxito na redução do edema em até 56% em 4h de experimento, sendo o α -bergamotene (12.4% and 2.6%), β -caryophyllene (2.8% and 4.8%) e α aromadendrene (5.2% and 2.0%) os principais compostos em comum (Veiga Jr et al. 2001).

Essas pesquisas demonstram que a administração de carragenina na pata de animais pode levar à ativação do sistema imune, e condicionar uma resposta de fase aguda de inflamação em poucas horas após a injeção. Esses dados permitem que a carragenina seja utilizada como um dos modelos de inflamação para experimentos de desenvolvimento de artrite aguda em animais, como mostrado nos estudos de BAO, Yarigui, et al. (2018), pois a AR é uma doença caracterizada pela progressão da inflamação e deficiência na modulação das atividades das células imunes (Bao et al., 2018; Smolen et al., 2018).

Dessa forma, com o avanço das pesquisas cada vez mais são utilizados modelos experimentais inflamatórios já reproduzidos anteriormente e com uma vasta literatura por trás demonstrando seus efeitos locais e sistêmicos na inflamação. A utilização do óleo de copaíba frente a uma inflamação desencadeada pela carragenina ainda não está elucidada, e pesquisas que buscavam desenvolver esse tema trazem ótimas perspectivas para o tratamento prioritário ou alternativo de doenças inflamatórias articulares.

2.3 Prevenção e tratamento de manifestações articulares

Os programas de prevenção de manifestações articulares tem suas limitações em vigência da fisiopatologia da doença, porém os focos são a redução de fatores de riscos, brevidade e rapidez diagnóstica e efetividade nos tratamentos farmacológicos (Smolen et al. 2018).

A melhoria do diagnóstico e do tratamento de doenças articulares nos últimos anos é consequência de vários fatores positivos que puderam detectar precocemente marcadores imunológicos ou genéticos e indicar uma ação específica por meio de fármacos contra citocinas pró-inflamatórias. O objetivo do tratamento é a remissão da doença (ou pelo menos uma baixa atividade), que possa normalizar a função física, na doença precoce, e maximizar a função físico-motora na doença estabelecida, priorizando reduzir ou eliminar o dano articular (Smolen et al. 2010).

Nesse contexto, estudos vem demonstrando que o uso de medicamentos modificadores de doença (DMARDs) associados a glicocorticoides de curto prazo estão proporcionando uma maior eficácia terapêutica apresentando uma remissão da doença rigorosamente em 25% dos pacientes dentro de 6 meses, além de levar a uma estagio de baixa atividade da doença (Maini et al. 1998). Além disso, a administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) também é indicada para aliviar a dor e o inchaço nas articulações (Faleiro, Araujo, and Varavallo 2011).

Contudo, o uso de fármacos a longo prazo, para tratar lesões articulares, causa um impacto econômico para a saúde pública e um impacto na saúde dos pacientes, devido às altas doses medicamentosas e o uso prolongado de glicocorticoides, que podem trazer efeitos colaterais (Van Vollenhoven 2009).

Por exemplo, o Metotrexato (MTX) um tipo de DMARD sintético, já apresentou riscos de toxicidade hepática, citopenia grave e insuficiência renal em doses equivalentes às utilizadas nos tratamentos, e é um dos medicamentos mais empregados para tratar a AR, por exemplo. AINEs como o ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno, são fármacos inibidores da ciclooxigenase (COX) que podem ter um efeito adverso tóxico, principalmente a longo prazo (Cipriani et al. 2014; Salliot and van der Heijde 2009). Danos hepáticos, gastrointestinais, deficiência de fatores de coagulação, insuficiência renal são alguns dos problemas que podem ser ocasionados com o uso desses fármacos em grandes quantidades (>2045mg para ibuprofeno) por um período de 6 meses a 30 meses (Nissen et al. 2016; Scheiman 2016).

Com isso, alternativas terapêuticas vêm sendo empregadas no tratamento de doenças articulares, para que cada vez mais haja a remissão da doença e o aumento da qualidade de vida de pacientes acometidos, e dentre essas alternativas terapêuticas, está o óleo de copaíba (Barros Bértolo 2007; Smolen et al. 2018).

JUSTIFICATIVA

O óleo de copaíba é um óleo-resina utilizado para diversos fins medicinais, tanto pela população brasileira quanto pela população de outros países. É um produto que já tem seu papel anti-inflamatório e edematogênico evidenciado em diversos estudos em modelos animais e humanos.

O óleo-resina pode ser utilizado através da ingestão oral ou tópica, sendo mais comum a utilização tópica por meio do óleo *in natura* ou associado a pomadas e cremes. O seu uso é seguro e já foi aprovado pela FDA e pela ANVISA, como um produto de origem vegetal que pode ser consumido ou utilizado para tratar algumas enfermidades.

Os dados apresentados trazem boas perspectivas quanto as propriedades biológicas do óleo, pois gera interesse para a população entender se o óleo de copaíba pode realmente trazer resultados positivos no tratamento de algumas doenças. Como exemplo de uma dessas doenças, é a AR, que é uma doença inflamatória crônica, autoimune, que ainda não tem cura e acomete milhares de pessoas no mundo todo.

A AR é uma doença progressiva e incapacitante, afeta tanto a condição física, emocional e financeira dos pacientes, e hoje em dia, os medicamentos empregados ainda não conseguem trazer a cura, somente a remissão da doença e ao longo do tempo podem levar a efeitos colaterais lesivos ao indivíduo.

Estudos que utilizam modelos animais experimentais para induzir uma inflamação na articulação, são usados como parâmetros para avaliar a patogênese de doenças inflamatórias, e dentre esses modelos experimentais, está a carragenina, um polissacarídeo retirado da parede celular de algas vermelhas que é capaz de induzir uma inflamação local rápida após a sua aplicação na cartilagem de animais murinos.

Vários estudos contemplam o uso da carragenina como modelo inflamatório, e muitos desses evidenciaram o potencial farmacológico de diversos produtos capazes de minimizar os efeitos causados na inflamação crônica da AR, mas ainda carece de estudos com o tratamento tópico com o óleo de copaíba.

Há a necessidade de se entender como que as propriedades medicinais do óleo-resina são capazes de modular a resposta imune, como: reduzir as atividades de citocinas inflamatórias, diminuir o infiltrado celular para o sítio da inflamação na fase aguda e aumentar as funções de células resolúvas, que inibem as atividades pró-inflamatórias e promovem a liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios.

Com isso, entendo a patogênese de doenças inflamatórias e a importância que elas têm para sociedade, e buscando produtos alternativos ao tratamento dessas doenças, o objetivo do nosso estudo foi analisar como que o óleo de copaíba, aplicado topicamente, atua eficientemente como anti-inflamatório e antiedematogênico, reduzindo a ação das citocinas pró-inflamatórias e a ação das células do sistema imune em um modelo de inflamação induzida carragenina em camundongos.

OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Avaliar os efeitos da aplicação tópica do óleo de copaíba sobre a inflamação induzida por carragenina em camundongos Balb/c.

3.2.Objetivos específicos

- a) Avaliar o papel antiedematogênico da administração tópica do óleo de copaíba;
- b) Avaliar o papel anti-inflamatório local pós administração tópica do óleo de copaíba;
- c) Investigar o efeito da aplicação tópica do óleo de copaíba sobre os mecanismos da resposta imune.
- d) Analisar o efeito das citocinas envolvidas nos animais tratados e não tratados.
- e) Integrar todos os parâmetros investigados em uma análise multivariada que permita aceitar ou rejeitar o papel anti-inflamatório e antiedematogênico da aplicação tópica do óleo de copaíba sobre animais induzidos a inflamação por carragenina..

MATERIAL E MÉTODOS

3.3. Animais experimentais

Camundongos Balb/c fêmeas, pesando entre 18-22 g, foram fornecidos pelo Biotério Central do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Os procedimentos metodológicos com os animais foram previamente submetidos e, em seguida, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA-INPA) (Anexo 1). Os animais foram randomizados e distribuídos em 4 grupos, com 6 animais em cada grupo e foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada a 20-22° C, com ciclo de claro-escuro a cada 12 horas e com livre acesso a comida e água.

3.4. Indução da inflamação

Foram utilizados para a indução da inflamação 1 g de Carragenina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluída em 100 mL de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%). Foi realizada a inoculação de Carragenina 1% (100 µL/pata) na articulação tibiotarsal (TBT) da pata esquerda traseira dos animais, exceto no grupo salina (controle). A inoculação foi feita com o auxílio de uma seringa (1 mL) e uma agulha 30 G.

3.5. Óleo de copaíba

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) utilizado nesse trabalho, foi fornecido pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Foi coletado em 04 de abril de 2021, na Vacinal Corruga 1, km 13, na fazenda do Sr. Luís Lemke, no município de Apuí (Coordenadas: 7°16'17.0"S 59°54'30.8"W). O acesso foi cadastrado na plataforma SISGEN do Ministério do Meio Ambiente. O óleo-resina foi mantido em frascos de plástico, envolto com papel laminado à temperatura ambiente até sua utilização (Silva 2019).

Foi realizada a análise da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) na Central Analítica, Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) - UFAM. A análise do óleo essencial foi realizada em um equipamento GC-MS modelo TRACE GC ULTRA/ ISQ (Thermo Scientific) usando detector seletivo e coluna capilar TR5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Thermo Scientific). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 1 mg de óleo em 1 mL de acetato de etila grau HPLC, sendo injetado 1 µL de solução em modo Split, na razão 1:25. Programação de temperatura do forno de acordo com Silva e colaboradores (2013). A percentagem de cada substância foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todas as substâncias presentes na amostra e o resultado multiplicado por 100. O β-cariofileno foi identificado como o composto majoritário em comparação com a biblioteca do equipamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas do óleo bruto de copaíba.

Nº	RT	Compounds	Area %
1	4,42	Octanoic acid	4,53
2	5,81	Pentanone <4-hydroxy-4-methyl-2	2,17
3	5,88	Ethoxy etanol	1,52
4	7,58	butanoic acid	0,74
5	8,66	Ethoxy ethyl acetate	2,76
6	24,4	α -Cubebene	1,63
7	25,09	α -Ylangene	0,35
8	25,24	α -copaene	14,57
9	25,7	β -cubebene	0,23
10	25,77	β -elemene	0,27
11	26,6	β-Caryophyllene	16,2
12	27,15	α -trans-Bergamotene	2,68
13	27,65	α -humulene	1,66
14	28,39	γ -Muurolene	1,93
15	28,5	Germacrene D	0,7
16	29,12	α -Muurolene	0,49
17	29,39	γ -Cadinene	5,8
18	29,8	δ -Cadinene	6,58
19	49	Copalic acid methyl ester	9,25
20	51,53	1-naphthalenecarboxylic acid	6,15
21	56,46	6-(1-Hydroxymethylvinyl)-4	13,51
Total			93,72

O óleo-resina de copaíba foi aplicado topicamente *in natura* nas patas esquerdas dos animais no volume de 100 μ L/pata 3 h após a indução da inflamação por Carragenina.

3.6. Delineamento experimental

Os camundongos (n = 24) foram randomizados em 4 grupos de 6 animais compondo os seguintes tratamentos:

(i) Salina (inoculação de solução salina nas TBTs seguida pelo uso tópico de Tween40 como placebo);

(ii) Carrag 1% (inoculação de Carragenina a 1% nas TBTs seguida pelo uso tópico de Tween 40);

(iii) Diclo (inoculação de Carragenina a 1% nas TBTs seguida pelo uso tópico de gel de diclofenaco 11,6 mg/g, volume de 100µL/pata);

(iv) Cop (inoculação de Carragenina 1% nas TBTs seguida pelo uso tópico de óleo de copaíba *in natura*, volume de 100µL/pata).

A experimentação durou 5 horas, sendo que, no tempo 0 h todos os animais, exceto o grupo Salina, receberam Carragenina. O tratamento com copaíba teve início no tempo 3 h.

3.7. Análise de edema nas articulações

O edema de pata foi avaliado por medição da espessura das patas traseiras esquerdas dos camundongos. A medição foi realizada nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a indução da inflamação por Carragenina.

Para a medida, o animal foi cuidadosamente imobilizado e utilizando uma folha de papel milimetrado posicionada fixamente no plano horizontal foram tiradas fotos das patas traseiras esquerdas. As imagens foram analisadas no software de análise de imagens ImageJ (Rasband 1997) calculando a variação da espessura da pata em centímetros (cm). E os resultados foram apresentados como a média dos valores da espessura obtidos três vezes consecutivas (Fig. 1).

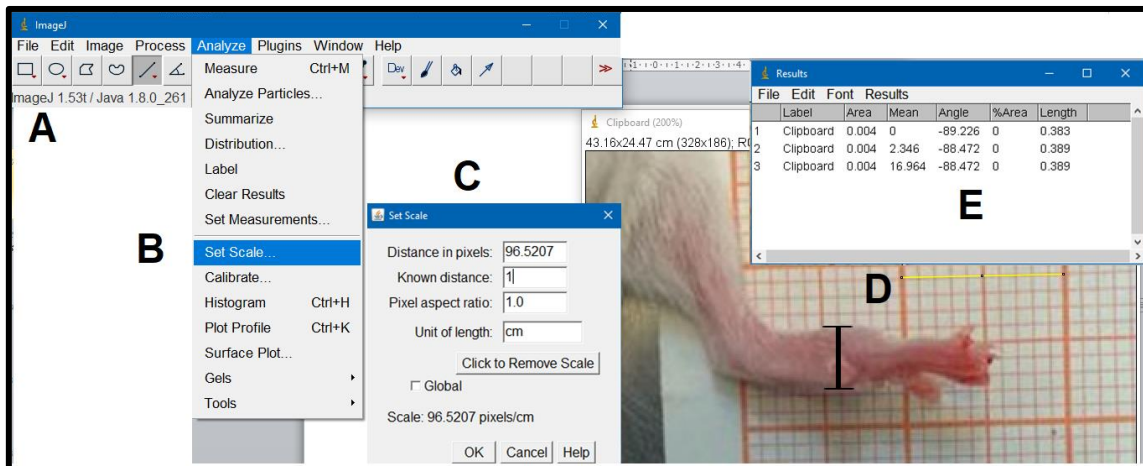


Figura 1 - Protocolo para a medição da espessura das patas pelo programa ImageJ. A. Painel principal do programa. B. Calibração das medidas pelo papel milimetrado. C. Entrada dos dados de calibração nos botões *Analyze > Set Scale*. Neste caso, a medida de 1 cm traçada no papel milimetrado (linha amarela) equivale a 96,52 pixels. D. Três medidas repetidas foram efetuadas na mesma região da pata e os valores obtidos são apresentados na tabela de resultados (E). A média aritmética desses valores representou a espessura da pata de um animal

3.8. Coleta de sangue e eutanasia

Após 5 horas da indução da inflamação por Carragenina, os animais foram imobilizados e, após anestesia com cetamina (82 mg/kg, via intraperitoneal) e xilazina (5,75 mg/kg, via intraperitoneal) o sangue foi coletado via punção cardíaca (500 μ L) e separado em duas subamostras: (i) sangue total destinado a hematologia convencional e (ii) sangue a ser centrifugado para a obtenção de plasma. Após a coleta os animais foram eutanasiados por deslocamento da coluna cervical.

3.9. Hematologia

Cerca de 50 μ L de sangue foi analisado no equipamento Cell Dyn Ruby (*Abbott Hematology*) por citometria de fluxo a laser (MultiAngle Polarized Scatter Separation,

ou Separação e Dispersão Polarizada com Vários Ângulos - MAPSS), o equipamento estava devidamente calibrado conforme os procedimentos informados no manual do fabricante. Foram analisadas a contagem total de leucócitos (White blood cells – WBC) e a contagem diferencial de leucócitos.

3.10. Determinação das concentrações de citocinas

O sangue foi centrifugado (Centrífuga Mod. 1-15, Sigma-Aldrich Co., USA) a 3500 rpm por 10 minutos e o plasma foi separado em tubos individuais e armazenado em nitrogênio líquido a -80°C, para preservação do conteúdo biológico até a análise das concentrações das citocinas no dia seguinte.

As concentrações de IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ foram determinadas no plasma por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSCanto II flow cytometer®) usando o kit comercial (Cytometric Bead Array CBA mouse Th1/Th2 Cytokine kit) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 50 μ L de plasma foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 50 μ L de uma solução contendo as “beads” de captura revestidas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e em seguida adicionados 50 μ L do reagente de detecção (anticorpos monoclonais). Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente e protegido da luz, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem em cada amostra e as mesmas foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos, a 20° C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 300 μ L de tampão de lavagem e posteriormente as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array® e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Para comparação das médias foi utilizada análise de variância one-way (ANOVA). Para a análise do edema de pata utilizou-se a análise de variância two-way (ANOVA) considerando a interação entre os grupos e o tempo. O pós-teste de Tukey foi aplicado para as múltiplas comparações. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. O programa estatístico Prisma (GraphPad Software, Inc. USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Para as análises multivariadas utilizou-se o programa PAST-Paleontological Statistics, versão 3.14 (HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN 2001).

RESULTADOS

As alterações no edema de pata estão mostradas na Fig. 1. Três momentos na dinâmica do edema ficaram visíveis: 1, momento imediato pós inflamação, onde a pata permaneceu inalterada; 2, momento em que o processo inflamatório instalado avança para culminar em edema significativo em Carrag 1%, Diclo e Cop; 3, momento em que se observa a redução do edema nos grupos citados aos níveis da Salina. Carrag 1% permaneceu elevada em relação à Salina a partir do tempo 3 h até o final da experimentação. A copaíba foi eficiente em manter o edema nos níveis da Salina nos tempos 4 e 5 hs.

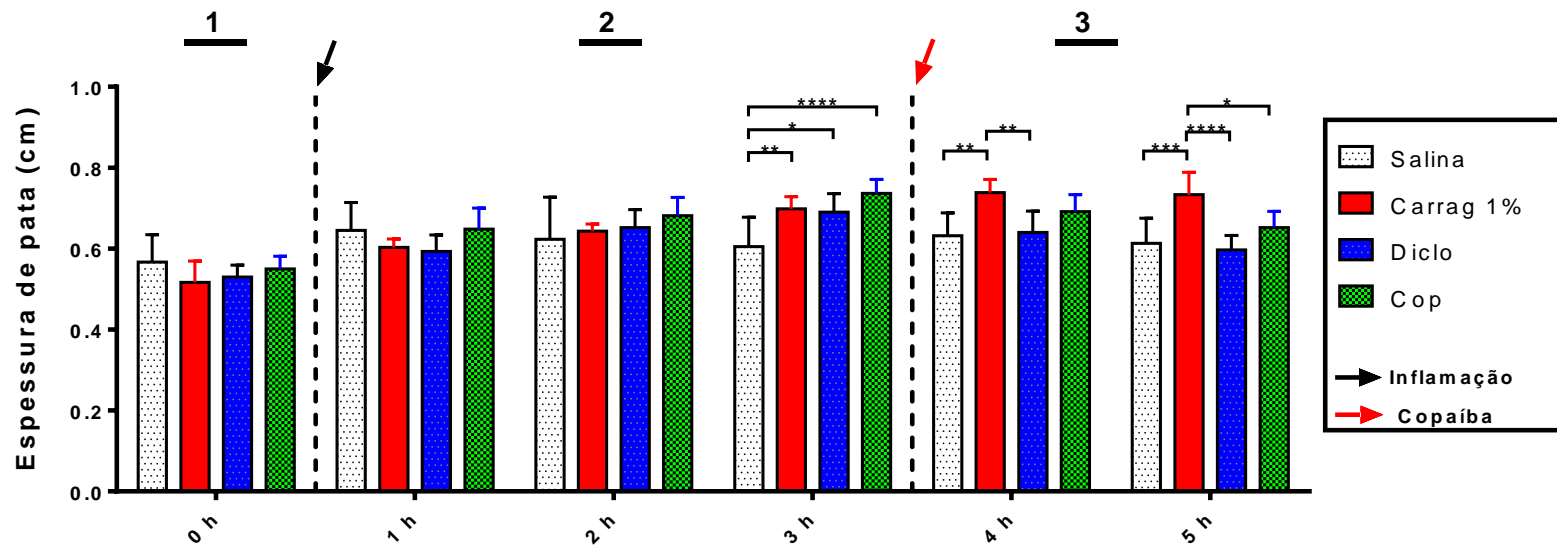


Figura 2 – Espessura da pata. 1, Pré-inflamação; 2, Pós inflamação; 3, Ação dos tratamentos. As setas indicam inoculação de Carragenina (preta) e aplicação tópica de copaiba (vermelha). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p = 0,001$; **** = $p < 0,001$.

O WBC aumentou significativamente nos animais do grupo Carrag 1% em relação ao grupo Cop (Fig. 3A). O grupo Cop conseguiu manter o WBC nos níveis próximos ao grupo Salina e do grupo Diclo. Esse mesmo comportamento foi observado na análise do número de linfócitos, com um aumento significativo no grupo Carrag 1% (Fig. 3B). Apesar da variação no número de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, não houve diferença significativa na comparação entre as médias dos grupos (Fig. 3C-F).

Houve uma redução significativa do IFN- γ no grupo Cop em comparação com o grupo Carrag 1% (Fig. 4A), já quando se avaliou a concentração da IL-6 houve um aumento significativo no grupo Cop em relação ao grupo Salina e ao grupo Diclo (Fig. 4B). Diferentemente da IL-6, o TNF diminuiu significativamente no grupo Cop em relação do grupo Diclo 1%, e esse mesmo evento aconteceu quando se analisou a concentração de IL-17A (Fig. 4E), evidenciando uma redução significativa no grupo Cop em relação ao grupo não tratado (Fig. 4C). A IL-10 apresentou um aumento significativo no grupo Cop em relação ao grupo Carrag 1% e Salina, já o grupo Diclo apresentou um aumento significativo em relação ao grupo Cop (Fig. 4D). Esses fatos não foram vistos na análise da IL-4, pois mesmo com uma variação nos parâmetros entre os grupos, não foi evidenciada uma diferença significativa (Fig. 4F).

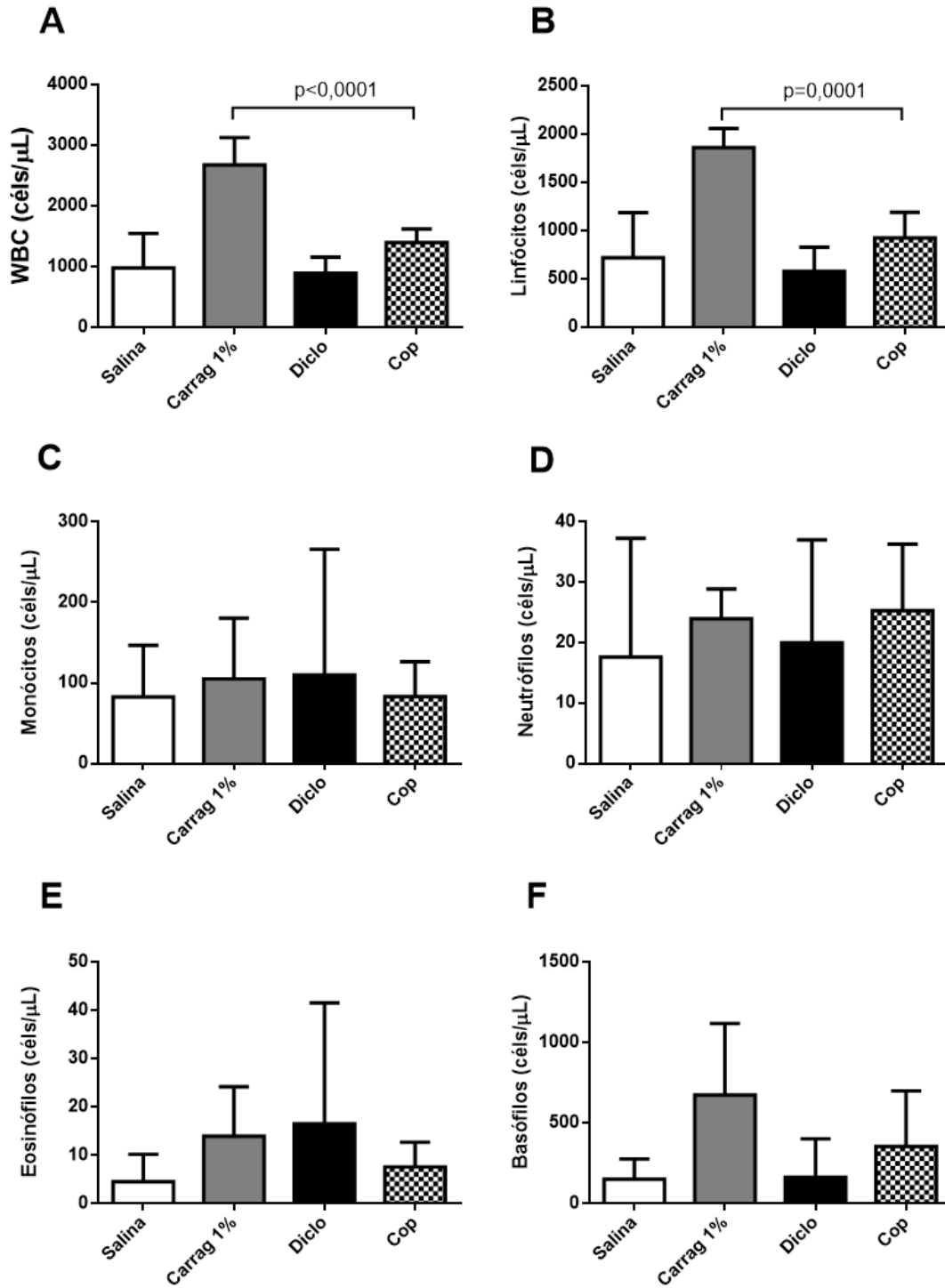


Figura 3 - Avaliação dos leucócitos. A. Número total de Leucócitos (WBC); B. Número de neutrófilos; C. Número de linfócitos; D. Número de monócitos; E. Número de eosinófilos; F. Número de basófilos. Diferença significativa indicada.

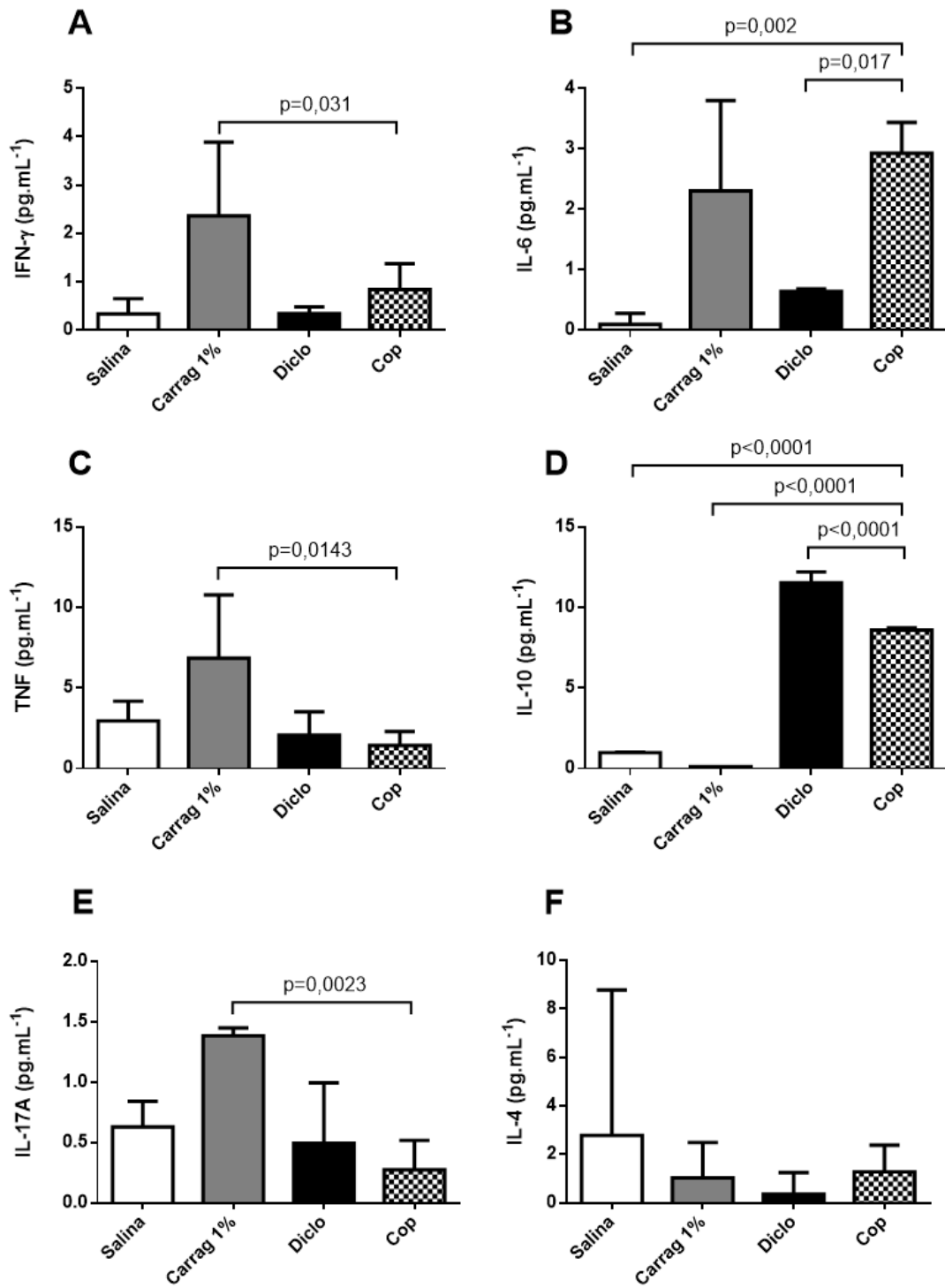


Figura 4 - Concentração de citocinas. A. IFN- γ ; B. IL-6; C. TNF; D. IL-10; E. IL-17A; F. IL-4. Diferença significativa indicada.

A análise multivariada reduziu a complexidade dos dados em 2 componentes (PC1 e PC2) que, juntos, explicaram 53,08% da variabilidade dos dados e o desfecho dos nossos resultados. Na análise, é notável a separação dos animais do grupo Carrag 1% dos demais grupos. Cop permaneceu similar a Salina e Diclo, embora apresentando alguma dispersão entre seus indivíduos. Quanto ao direcionamento dos vetores em relação aos grupos, que indica como e quanto determinado parâmetro afetou a distribuição (setas verdes), a seguinte configuração foi obtida:

- O grupo Carrag 1% apresentou os maiores valores positivos para os seguintes parâmetros (em ordem de significância): WBC, edema (5h), linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF;
- Os grupos Diclo e Salina apresentaram os maiores valores positivos para os seguintes parâmetros (em ordem de significância): IL-17A e IL-10;
- O grupo Cop apresentou um comportamento diferente dos grupos acima, apresentando os maiores valores positivos para os seguintes parâmetros (em ordem de significância): IFN- γ , IL-17A e IL-10.

Quanto à correlação entre os parâmetros, o seguinte resultado foi obtido: WBC, edema, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos IL-6 e IL-4 apresentaram elevada correlação positiva entre si, indicando ser mais favorável ao grupo não tratado induzido à inflamação. Já a IL-10 e IL-17A apresentaram elevada correlação positiva entre si, demonstrando valores positivos para alguns animais dos grupos Salina, Diclo e Cop. O mesmo comportamento pôde ser observado com os parâmetros TNF e IFN- γ que apresentaram uma maior correlação entre si, demonstrando valores positivos para alguns animais do grupo Carrag 1%, evidenciando também um perfil diferenciado desse composto em alguns animais.

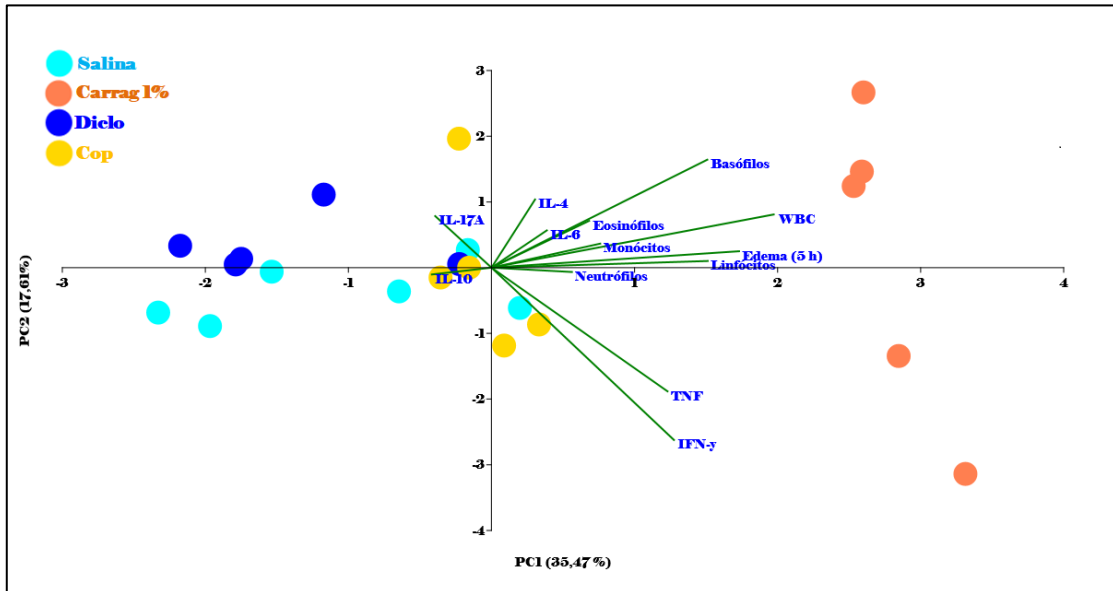


Figura 5 - Análise multivariada. O eixo horizontal (x) explicou 35,47 % da variabilidade dos dados, enquanto que o eixo y explicou 17,61 %. WBC, edema, linfócitos, basófilos, TNF e IFN- γ foram os parâmetros que mais contribuíram em toda a análise. Os círculos coloridos representam os animais deste estudo separados por grupos. Carrag 1% apresentou características que diferiram dos demais grupos. Os animais tratados com copaíba apresentaram características próximas dos grupos Salina e Diclo.

DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou evidências que comprovam que o uso tópico da copaíba tem propriedades anti-inflamatórias e antiedematogênicas na inflamação aguda em modelo murino. Esses resultados são promissores para que este produto natural possa ser disponibilizado de forma comercial à população seguindo as normas vigentes dos setores de saúde e vigilância sanitária competentes. A copaíba é um produto muito conhecido no Brasil e no mundo, sendo utilizado há muitos anos topicamente para o tratamento de diversas enfermidades. Os seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antiedematogênicos, antibacterianos e antifúngicos já foram evidenciados em estudos anteriores (Biondo-Simões et al., 2019; Castro Ghizoni et al., 2017; Gomes et al., 2007; Lucca et al., 2017; Vargas, 2013), contudo ainda não estava esclarecido como o óleo-resina, aplicado topicamente, modula o sistema imunológico, regulando a ativação e a inibição de citocinas e como pode influenciar a atividade das células imunes frente à uma inflamação.

Dentre os compostos presentes no óleo de copaíba, com comprovada eficácia anti-inflamatória, está o β -cariofileno (Barbosa et al. 2018; Caputo et al. 2020; Castro Ghizoni et al. 2017) Em nosso estudo, esse composto representou 16,2 % do total, portanto, nosso óleo está em conformidade com os estudos prévios e isso pode explicar os efeitos anti-inflamatórios e anti-edematogênicos evidenciados em nosso experimento.

O β -cariofileno é um sesquiterpeno presente em algumas espécies vegetais (Annonaceae, Cordia, Verbenácea, Lamiaceae, etc.) que tem a capacidade de se ligar a receptores canabinóides do tipo 2 (CB2) (de Cássia Da Silveira e Sá, Andrade, and De Sousa 2015). Esses receptores estão mais presentes nos tecidos periféricos, são ligados ao sistema canabinoide, e são responsáveis pela modulação de funções neuronais e

processos inflamatórios. Foi identificado que o CB2 está ligado a funções de atenuação da dor e da inflamação, assim quando o β -cariofileno se liga a esse receptor ele tem a capacidade de inibir a produção de citocinas inflamatórias e a ativação celular (Gertsch et al. 2008).

Ainda que a copaíba apresente muitos defensores, ainda não há um consenso sobre seu potencial inflamatório (Hebert et al. 2017). Parte desses argumentos pode estar relacionada às características dos óleos utilizados, visto que as atividades biológicas diferem entre os óleos brutos e os destilados, sendo os primeiros apresentando uma maior atividade biológica devido ao sinergismo de seus componentes. Nossos dados trazem resultados sobre o uso tópico do óleo bruto, mas seria de grande interesse um trabalho que pudesse esclarecer uma comparação entre os efeitos do uso tópico do óleo bruto e do óleo destilado sobre inflamações articulares.

A carragenina é um modelo experimental de inflamação usado há muitos anos, pois consegue promover uma resposta rápida do sistema imunológico (Necas & Bartosikova, 2013). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram um pico máximo de edema de pata entre cinco e seis horas após o início da indução (de Matos Gomes et al., 2010; Moilanen et al., 2012; Posadas et al., 2004; Wise et al., 2008). Em nosso estudo, a indução de carragenina 1% resultou em um início de edema após três horas, com continuação da curva ascendente de edema até cinco horas, quando finalizamos a experimentação (Fig. 1).

Em nosso estudo, nós conseguimos evidenciar o papel anti-edematogênico do óleo de copaíba, pois logo após 1 hora de inflamação já foi possível observar uma redução significativa do edema nos camundongos tratados. Esses dados corroboram com a literatura, onde foi comprovado que diferentes espécies de copaíbas também são

capazes de inibir o edema de pata induzido por zymosan e carragenina em modelos murinos (Junior et al., 2007; Veiga et al., 2006).

Nesse contexto, a indução via carragenina promove uma inflamação local com ativação das células residentes no tecido, e com isso, há a expressão de citocinas como IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, TNF e IFN- γ , que atuam em diversos mecanismos para a regulação do processo inflamatório (Necas & Bartosikova, 2013). As citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-6, se direcionam para a medula óssea afim de ativar a produção e diferenciação de leucócitos, estimulando os progenitores mieloides, levando a uma leucocitose, e em conjunto, outras citocinas e quimiocinas participam no processo de recrutamento desses leucócitos para a região da inflamação (Mehta et al., 2015). Não avaliamos a infiltração leucocitária nos tecidos, porém, o aumento dos leucócitos circulantes é uma evidência da resposta imune aos antígenos de carragenina (Fig. 3). Estudos prévios mostraram que o óleo de copaíba é capaz de reduzir a permeabilidade vascular, papel crucial na resolução da inflamação (de Matos Gomes et al., 2010). Dessa forma, mesmo não evidenciando o infiltrado leucocitário nas articulações, podemos dizer que o infiltrado depende do número de leucócitos circulantes, e o óleo de copaíba sendo capaz de reduzir a leucocitose e diminuir a permeabilidade vascular, tem um papel biológico muito importante na resolução de distúrbios inflamatórios no nível sistêmico e local.

Sabe-se que os fagócitos, são células essenciais na regulação do processo inflamatório, sendo as primeiras células a chegarem ao sítio da inflação e atuarem contra os antígenos. Além de participarem da fagocitose, liberam citocinas necessárias para a continuidade da ativação do sistema imunológico (Kolaczowska and Kubes 2013; Serhan, Ward, and Gilroy 2010). No estudo de Junior et al. (2007), três espécies diferentes de copaíbas foram capazes de inibir significativamente o acúmulo de

leucócitos e neutrófilos após a inflamação causada pelo Zymosan. Esse papel também foi observado no estudo de Yasojima et al. 2013, onde o óleo de copaíba associado a uma tela de polipropileno aplicado sobre um defeito na parede abdominal de ratos foi capaz de inibir granulomas compostos por macrófagos (Yasojima et al. 2013). Porém, em nosso experimento, apesar de haver uma variação considerável nos grupos tratados, não houve diferenças significativas no número de neutrófilos e macrófagos, provavelmente relacionado ao estágio precoce do processo inflamatório.

As citocinas são responsáveis pela mediação das respostas imunes e em nosso estudo foi eminente o papel delas no desenvolvimento do processo inflamatório. Sendo assim, notou-se um comportamento diferente das citocinas do grupo Carrag 1% em comparação com Diclo e Cop (Fig. 4). Os níveis de IFN- γ , TNF e IL-17A foram significativamente maiores no grupo Carrag 1% em comparação com Diclo e Cop (Fig. 4). Esses resultados estão de acordo com o experimento de pesquisadores que analisaram o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar, onde foi mostrado que várias citocinas alteraram em poucas horas após a indução da inflamação. Substancialmente, houve um aumento na concentração de IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, e TNF- α em apenas três horas de inflamação, o que promoveu uma variação na dinâmica da atuação do sistema imune local e sistêmico (Annamalai and Thangam 2017).

O IFN- γ é uma potente citocina pró-inflamatória responsável por ativar, principalmente, a resposta Th1 nos linfócitos T CD4+, onde promove a apoptose de células danificadas ou infectadas, aumenta o poder de fagocitose dos macrófagos e ativa outros linfócitos (B e TCD8) (Kak, Raza, and Tiwari 2018). A ação do IFN- γ , no entanto está associada a algumas doenças inflamatórias e autoimunes como o diabetes do tipo 1, a AR e a esclerose múltipla (Raphael et al. 2015). Em nosso estudo, Cop

apresentou uma resposta inibitória satisfatória sobre o IFN- γ , tendo uma redução significativa em relação a Carrag 1%. Tendo em vista o papel do IFN- γ em algumas doenças inflamatórias, nosso resultado demonstra que o óleo possui propriedades anti-inflamatórias importantes sobre essa citocina e o relaciona como um potencial terapêutico alternativo.

A IL-6 é a principal citocina direcionadora da resposta de fase aguda na patogênese da AR, conforme evidenciado pela neutralização da IL-6 pelo anticorpo anti-IL-6R (tocilizumabe) (Choy and Rose-John 2017). Além disso, a IL-6 está envolvida na mudança de um estado inflamatório agudo para um crônico, tendo assim, um efeito pleiotrópico (Choy and Rose-John 2017). Níveis elevados de IL-6 foram detectados nos animais tratados com copaíba no presente estudo (Fig. 4). Portanto, nossos achados estão em desacordo com pesquisas recentes que mostram um papel inibidor dos β -cariofilenos sobre a síntese de IL-6 (Baradaran Rahimi and Askari 2022; Francomano et al. 2019).

Quando analisamos o TNF, sabemos que é uma citocina pró-inflamatória presente em desordens tumorais e respostas inflamatórias agudas, sendo expresso principalmente por macrófagos ativados. Essa citocina favorece a apoptose de células tumorais e promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 β , as quais são responsáveis pela regulação da inflamação (Kallioli and Ivashkiv 2016). O TNF está relacionado com diversas doenças inflamatórias reumáticas, pois ativa células que produzem proteínas que degeneram a cartilagem articular e o osso, como as metaloproteinases, colagenases e estromelinas. Por esse motivo, hoje em dia há tratamentos medicamentosos que atuam inibindo a ação dessa citocina, como o Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab dentre outros (Ma and Xu 2013). Em nosso estudo, foi notável a ação do óleo de copaíba frente à atividade do TNF, pois em

duas horas de tratamento já houve uma redução significativa nos animais do grupo Cop em comparação com os animais não tratados. O uso tópico da copaíba, reduzindo o TNF- α , também foi comprovado após sua aplicação em dano tecidual causado por queimaduras em ratos Wistar (Gushiken et al. 2017).

No presente estudo, a IL-10 apresentou comportamento oposto em Carrag 1% e Cop, reduzindo seus níveis na primeira e aumentando-os na segunda (Fig. 4). A IL-10 promove a diferenciação de monócitos a macrófagos M2, inibe a ação de citocinas pró-inflamatórias e a ação da fagocitose pelos macrófagos, promove a inibição da expressão de moléculas do MHC II, além de limitar a diferenciação de linfócitos T CD4+ (Sabat et al., 2010). Esses mecanismos são essenciais para a manutenção do processo inflamatório, pois reduzem os efeitos citotóxicos às células residentes no local da inflamação. Sabe-se que a IL-10 promove um efeito inibitório também na atuação das células Th17, por bloqueio da liberação de suas citocinas (Guo 2016). E em pacientes com AR foi demonstrado que o tratamento com IL-10 inibiu os fatores de transcrição específicos em células Th17 e, conseqüentemente, a expressão de citocinas IL-17. Além disso, nesse estudo foi evidenciado que, nesses pacientes tratados, a IL-10 promoveu um aumento na diferenciação em células Treg, que são essenciais no controle do processo inflamatório (Heo et al., 2010). Nossos resultados corroboram com esses achados, pois em duas horas de tratamento já houve uma redução significativa de citocinas IL-17 e um aumento significativo de IL-10 em Cop, o que sugere um perfil anti-inflamatório da aplicação tópica do óleo de copaíba.

Em nosso estudo, Cop manteve os níveis de IL-17A reduzidos em relação à Carrag 1% (Fig. 4). Essa citocina está envolvida na resposta de perfil Th17 dos linfócitos T CD4+, a qual é responsável por promover hematopoiese, recrutar e ativar leucócitos além de estar relacionada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias

como a AR e o lúpus eritematoso, inclusive a presença da IL-17 no líquido sinovial (Van Den Berg and Miossec 2009; McKenzie, Kastelein, and Cua 2006). A IL-17A auxilia na capacidade dos fibroblastos em produzir MMPs, na capacidade de regular positivamente a expressão de receptores para TNF e induzir a expressão de IL-6 pelos macrófagos, que ativam os osteoclastos, esses mecanismos acabam colaborando para o desgaste da matriz cartilaginosa do tecido ósseo esponjoso (Leipe et al. 2010). Nesse contexto, o Secuquinumabe, Brodalumabe e o Ixequizumabe são medicamentos sintéticos, anticorpos anti-IL-17, utilizados como medicamentos associados ao metotrexato no tratamento de AR. Contudo os dados da eficácia desses tratamentos ainda são controversos (Kunwar, Dahal, and Sharma 2016), por isso nossos dados trazem uma evidência muito importante, pois o óleo de copaíba pôde contribuir com a inibição da IL-17A.

O desenvolvimento de uma doença inflamatória crônica está associado com a progressão de uma inflamação aguda e a não resolução dessa inflamação por mediadores anti-inflamatórios (Headland and Norling 2015). Essa progressão da inflamação é justamente o que leva a degeneração tecidual do osso e da cartilagem, além de favorecer o aparecimento de doenças secundárias sistêmicas (Lefèvre et al. 2009; Smolen et al. 2018). Em nosso estudo, nós propomos um tratamento em curto prazo para verificar a ação do óleo de copaíba como um tratamento inicial e rápido de uma inflamação, contudo, sabemos que são necessários estudos mais aprofundados e com um tempo de experimentação maior para evidenciar o papel da aplicação tópica do óleo de copaíba sobre doenças inflamatórias de perfil crônico.

A perspectiva positiva que foi evidenciada aqui nos mostra que há um caminho promissor no uso tópico da copaíba como uma alternativa mais acessível e com menos efeitos colaterais quando comparado aos tratamentos padrões atualmente utilizados.

Sem dúvida que os maiores benefícios á saúde virão quando tivermos em mãos medicamentos mais eficazes e que resultem em menor comprometimento sistêmico. Embora sejam necessários mais estudos para melhor definir os efeitos sistêmicos do óleo de copaíba em animais, os resultados promissores obtidos até agora em vários modelos de estudos sugerem fortemente que este produto natural constitui um composto atraente para o tratamento de doenças caracterizadas por inflamação crônica.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a aplicação tópica da copaíba na inflamação aguda teve um efeito anti-edematogênico, inibiu a leucocitose e a linfocitose, reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF e IL-17A e aumentou o nível da citocina anti-inflamatória IL-10. O aumento na concentração de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, alimenta o debate sobre o papel da copaíba na inflamação. As principais características da inflamação por Carragenina foram patas edematosas/leucocitose/linfocitose e níveis elevados de TNF/ IFN- γ . O uso tópico do óleo bruto de copaíba tem demonstrado resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos, mostrando redução do edema e da resposta inflamatória em diferentes condições. Em resumo, a copaíba apresenta um potencial interessante como uma opção de tratamento alternativo para inflamações, especialmente no uso tópico. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer sua eficácia, segurança e formas adequadas de uso.

REFERÊNCIAS

- Ames-Sibin, Ana P et al. 2018. “B-Caryophyllene, the Major Constituent of Copaiba Oil, Reduces Systemic Inflammation and Oxidative Stress in Arthritic Rats.” *Journal of Cellular Biochemistry* 119(12): 10262–77.
- Amilia Destryana, R et al. 2014. “Antioxidant and Anti-Inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo.” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 91: 1531–42.
- Annamalai, Parvathi, and Elden Berla Thangam. 2017. “Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-Induced Paw Inflammation in Rats.” *Immunological Investigations* 46(3): 274–83.
- Baradaran Rahimi, Vafa, and Vahid Reza Askari. 2022. “A Mechanistic Review on Immunomodulatory Effects of Selective Type Two Cannabinoid Receptor B-caryophyllene.” *Biofactors* 48(4): 857–82.
- Barbosa, Maiara et al. 2018. “Copaiba Oil Decreases Oxidative Stress and Inflammation but Not Colon Damage in Rats with TNBS-Induced Colitis.” *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 18(3): 268–80.
- Barros Bértolo, Manoel. 2007. *Atualização Do Consenso Brasileiro No Diagnóstico e Tratamento Da Artrite Reumatóide Update on the Brazilian Consensus for the Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis*. Sergio Candido Kowalski. <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/26417/1/S0482-50042007000300003.pdf> (February 21, 2019).
- Van Den Berg, Wim B, and Pierre Miossec. 2009. “IL-17 as a Future Therapeutic

- Target for Rheumatoid Arthritis.” *Nature Reviews Rheumatology* 5(10): 549–53.
- Calil, Igor L et al. 2014. “Lipopolysaccharide Induces Inflammatory Hyperalgesia Triggering a TLR4/MyD88-Dependent Cytokine Cascade in the Mice Paw.” *PLoS one* 9(3): e90013.
- Caputo, Ludmila S et al. 2020. “Copaiba Oil Suppresses Inflammation in Asthmatic Lungs of BALB/c Mice Induced with Ovalbumin.” *International Immunopharmacology* 80: 106177.
- Carvalho, J C T et al. 2005. “Topical Antiinflammatory and Analgesic Activities of *Copaifera Duckei* Dwyer.” *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 19(11): 946–50.
- Cascon, Vera, and Benjamin Gilbert. 2000. “Characterization of the Chemical Composition of Oleoresins of *Copaifera Guianensis* Desf., *Copaifera Duckei* Dwyer and *Copaifera Multijuga* Hayne.” *Phytochemistry* 55(7): 773–78.
- de Cássia Da Silveira e Sá, Rita, Luciana Nalone Andrade, and Damião Pergentino De Sousa. 2015. “Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity.” *Natural product communications* 10(10): 1934578X1501001033.
- Castro Ghizoni, Cristiane V. et al. 2017. “Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats.” *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Chiu, Isaac M et al. 2013. “Bacteria Activate Sensory Neurons That Modulate Pain and Inflammation.” *Nature* 501(7465): 52–57.
- Choy, Ernest, and Stefan Rose-John. 2017. “Interleukin-6 as a Multifunctional

- Regulator: Inflammation, Immune Response, and Fibrosis.” *Journal of Scleroderma and Related Disorders* 2(2_suppl): S1–5.
- Cipriani, Paola et al. 2014. “Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Optimizing Therapy among Different Formulations. Current and Emerging Paradigms.” *Clinical therapeutics* 36(3): 427–35.
- Faleiro, Lilian Resende, Lucia Helena Resende Araujo, and Maurilio Antonio Varavallo. 2011. “A Terapia Anti-TNF-a Na Artrite Reumatóide.” *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 32(1): 77–94.
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/4746> (February 21, 2019).
- Ferro, Marcelo et al. 2018. “Meta-Analysis on Copaiba Oil: Its Functions in Metabolism and Its Properties as an Anti-Inflammatory Agent.” *Journal of Morphological Sciences* 35(03): 161–66.
- Francomano, Fabrizio et al. 2019. “ β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties.” *Applied Sciences* 9(24): 5420.
- Garcia, Rosângela Fernandes, and Miriam Harumi Yamaguchi. 2012. “Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica.” *Saúde e Pesquisa* 5(1).
- Gertsch, Jürg et al. 2008. “Beta-Caryophyllene Is a Dietary Cannabinoid.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(26): 9099–9104.
- Guo, Beichu. 2016. “IL-10 Modulates Th17 Pathogenicity during Autoimmune Diseases.” *Journal of clinical & cellular immunology* 7(2).
- Gushiken, Lucas Fernando Sérgio et al. 2017. “Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera*

Langsdorffii Desf. Kuntze in Rats.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST. 2001. “Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Biotic Recovery after the End Ordovician Mass Extinction View Project Early Triassic Geochemistry and Invertebrate Palaeontology in Central Spitsbergen, Svalbard View Projec.” *Palaeontologia electronica* 4(1): 9.

Headland, Sarah E, and Lucy V Norling. 2015. “The Resolution of Inflammation: Principles and Challenges.” In *Seminars in Immunology*, Elsevier, 149–60.

Hebert, Patricia et al. 2017. “Treatments for Inflammatory Arthritis: Potential but Unproven Role of Topical Copaiba.” *Integrative Medicine: A Clinician’s Journal* 16(2): 40.

Junior, V F Veiga et al. 2007. “Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of Copaiba Oils from *Copaifera Cearensis* Huber Ex Ducke, *Copaifera Reticulata* Ducke and *Copaifera Multijuga* Hayne—A Comparative Study.” *Journal of Ethnopharmacology* 112(2): 248–54.

Junior, V F Veiga, and Angelo C Pinto. 2002. “O Gênero *Copaifera* L.” *Quim. Nova* 25(2): 273–86.

Kak, Gunjan, Mohsin Raza, and Brijendra K Tiwari. 2018. “Interferon-Gamma (IFN- γ): Exploring Its Implications in Infectious Diseases.” *Biomolecular concepts* 9(1): 64–79.

Kallioliias, George D, and Lionel B Ivashkiv. 2016. “TNF Biology, Pathogenic Mechanisms and Emerging Therapeutic Strategies.” *Nature Reviews*

Rheumatology 12(1): 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.

Kolaczowska, Elzbieta, and Paul Kubes. 2013. “Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation.” *Nature reviews immunology* 13(3): 159–75.

Kunwar, Sumit, Khagendra Dahal, and Sharan Sharma. 2016. “Anti-IL-17 Therapy in Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Rheumatology international* 36(8): 1065–75.

Leandro, Lidiam Maia et al. 2012. “Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* Spp.) Oleoresins.” *Molecules* 17(4): 3866–89.

Lefèvre, Stephanie et al. 2009. “Synovial Fibroblasts Spread Rheumatoid Arthritis to Unaffected Joints.” *Nature medicine* 15(12): 1414.

Leipe, Jan et al. 2010. “Role of Th17 Cells in Human Autoimmune Arthritis.” *Arthritis & Rheumatism* 62(10): 2876–85.

Ma, Xixi, and Shengqian Xu. 2013. “TNF Inhibitor Therapy for Rheumatoid Arthritis.” *Biomedical reports* 1(2): 177–84.

Maini, Ravinder N et al. 1998. “Therapeutic Efficacy of Multiple Intravenous Infusions of Anti-tumor Necrosis Factor α Monoclonal Antibody Combined with Low-dose Weekly Methotrexate in Rheumatoid Arthritis.” *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 41(9): 1552–63.

McKenzie, Brent S, Robert A Kastelein, and Daniel J Cua. 2006. “Understanding the IL-23–IL-17 Immune Pathway.” *Trends in immunology* 27(1): 17–23.

Necas, Jiri, and Ladislava Bartosikova. 2013. “Carrageenan: A Review.” *Veterinarni medicina* 58(4).

- Nissen, Steven E et al. 2016. "Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis." *New England Journal of Medicine* 375: 2519–29.
- Pearson, Carl M. 1956. "Development of Arthritis, Periarthritis and Periostitis in Rats given Adjuvants." *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 91(1): 95–101.
- Raphael, Itay, Saisha Nalawade, Todd N Eagar, and Thomas G Forsthuber. 2015. "T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases." *Cytokine* 74(1): 5–17.
- Rasband, Wayne S. 1997. "ImageJ."
- Salliot, Carine, and Désirée van der Heijde. 2009. "Long-Term Safety of Methotrexate Monotherapy in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Research." *Annals of the rheumatic diseases* 68(7): 1100–1104.
- Scheiman, James M. 2016. "NSAID-Induced Gastrointestinal Injury." *Journal of clinical gastroenterology* 50(1): 5–10.
- Serhan, Charles N, Peter A Ward, and Derek W Gilroy. 2010. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press.
- Silva, Evandro de Araújo. 2019. "Avaliação Química e Farmacológica Do Óleo Destilado de Copaiba (Copaifera Spp.-LeguminosaeCaesalpinoideae) e Aplicações Biotecnológicas."
- Smolen, Josef S et al. 2010. "Estimation of a Numerical Value for Joint Damage-Related Physical Disability in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials." *Annals of the rheumatic diseases* 69(6): 1058–64.
- . 2018. "Rheumatoid Arthritis." *Nature Reviews Disease Primers* 4(1): 18001.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.

Takeda, Kiyoshi, Tsuneyasu Kaisho, and Shizuo Akira. 2003. "Toll-like Receptors."

Annual review of immunology 21(1): 335–76.

Veiga Jr, Valdir F et al. 2001. "Phytochemical and Antioedematogenic Studies of

Commercial Copaiba Oils Available in Brazil." *Phytotherapy Research* 15(6):

476–80.

Van Vollenhoven, Ronald F. 2009. "Treatment of Rheumatoid Arthritis: State of the Art

2009." *Nature Reviews Rheumatology* 5(10): 531–41.

Yasojima, Edson Yuzur et al. 2013. "Effect of Copaiba Oil on Correction of Abdominal

Wall Defect Treated with the Use of Polypropylene/Polyglecaprone Mesh." *Acta*

cirurgica brasileira 28: 131–35.