



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent*-hardwíckiico

Guilherme Venâncio Símaro

Ribeirão Preto
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

GUILHERME VENÂNCIO SÍMARO

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent*-hardwíckiico

Ribeirão Preto
2021

GUILHERME VENÂNCIO SÍMARO

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent*-hardwíckiico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2021

SIMARO, G.V

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent-hardwíckii*co

Espaço de 2,5 cm reservado
para etiqueta de localização
da biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Símaro, Guilherme Venâncio

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent-hardwickiico*. Ribeirão Preto, 2021.

92 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp

1. *Copaifera pubiflora*. 2. ácido *ent-hardwickiico*. 3. Oleorresina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Venâncio Símaro

Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleoresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent-hardwickiico*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador(a): Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha família
e as pessoas que me apoiaram e acreditaram em mim

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço, primeiramente, a Deus por me conceder a oportunidade de concluir mais uma etapa da minha caminhada, me fortalecendo e iluminando a cada dia;

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela confiança, respeito, profissionalismo e ensinamentos;

Ao meu amigo Me. Victor Pena Ribeiro pela paciência e pela imensurável contribuição intelectual a mim transmitida;

Aos meus pais Paulo Sérgio Símaro e Silvia Venâncio da Costa Símaro, meu infinito agradecimento, pois sempre me incentivaram para poder ir em busca dos meus sonhos. Ambos são exemplos de honestidade, trabalho, esforço e luta diária;

À minha namorada Paolla Algarte Fernandes pela paciência, incentivo, confiança e por todas as palavras positivas e aquecedoras. Obrigado por acreditar e apostar em mim.

À minha irmã Andressa Venâncio Símaro por todo apoio, confiança e suporte que sempre me transmitiu e ao meu irmão Gabriel Venâncio Símaro, que me auxiliou em todos os momentos com sua alegria e afetividade;

À minha cunhada e amiga Tassiana Algarte Fernandes pelo apoio em todos os momentos e pelo companheirismo;

Ao Prof. Dr. Márcio Luís Andrade e Silva pelo suporte e pelos ensinamentos;

Aos professores do Programa do Doutorado em Ciências Farmacêuticas pelos momentos compartilhados de conhecimentos e troca de experiências;

Agradeço também à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP por abrir as portas para que eu pudesse realizar esse sonho, proporcionando-me a oportunidade de buscar conhecimento técnico e científico;

À Universidade de Franca – UNIFRAN pela contribuição e colaboração em participar desta pesquisa;

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido durante o doutorado.

Enfim, a todos os demais que contribuíram para que este projeto se realizasse.

RESUMO

SÍMARO, G.V. **Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido *ent-hardwickiico***. 2021. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os nomes populares das espécies de *copaífera* são "copaibas, copaibeiras, copaívas ou pau d'óleo", amplamente utilizadas na medicina popular brasileira. Dentre todas as aplicações etnofarmacológicas descritas para oleorresinas de *Copaifera* spp, destacam-se seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. No entanto, o conhecimento das propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas da *Copaifera pubiflora* Benth é escasso. Levando isso em conta, investigaram-se as atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *Copaifera pubiflora* (OCP) e de seu metabólito majoritário, ácido *ent-hardwickiico* (AH). O ensaio de fosfatase ácida foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da OCP e do AH em três diferentes linhagens celulares. As doses de 1, 3 e 10 mg/kg da OCP e do AH foram empregadas nos ensaios biológicos. A avaliação da atividade motora foi realizada por meio de testes de campo aberto e Rota Rod. A atividade anti-inflamatória da OCP e do AH foi avaliada utilizando-se os seguintes ensaios farmacológicos: edema de pata induzido por carragenina, hiperalgesia induzida por carragenina, determinação de INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em um sistema multi-spot utilizando a linhagem celular imortalizada THP-1, artrite induzida por zymosan e pelo ensaio da luciferase. Os testes de formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético foram realizados para avaliar o potencial antinociceptivo da OCP e do AH. O teste de retirada de cauda (*Tail-flick*) foi utilizado para avaliar possíveis efeitos centrais da OCP e do AH. Na avaliação da citotoxicidade, a OCP e o AH não foram citotóxicos para as linhagens testadas. A OCP e o HA (10 mg/kg) não afetaram a capacidade locomotora dos animais nos testes de campo aberto e Rota Rod. No edema de pata induzido por carragenina o AH e a OCP apresentaram inibições significativas, sendo as doses de 10 mg/kg as mais eficazes, registrando inibições máximas de $58 \pm 8\%$ e $76 \pm 6\%$, respectivamente, $p < 0,05$. Tanto AH quanto OCP diminuíram significativamente a intensidade da hipernocicepção inflamatória no ensaio de hiperalgesia induzida por carragenina em todas as doses testadas, sendo a dose de 10 mg/kg a mais eficaz com inibições máximas de $74 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) e $76 \pm 3\%$ ($p < 0,01$) respectivamente. Em células THP-1 estimuladas por LPS, os tratamentos com AH e OCP diminuíram os níveis de INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em 24 e 72 h. Na artrite induzida por zymosan, a OCP e o AH diminuíram o número de neutrófilos na articulação de camundongos artríticos e o número de leucócitos totais ($p < 0,05$). Além disso, o AH e a OCP diminuíram significativamente o edema das articulações ($p < 0,05$). A OCP e o AH também aumentaram o limiar mecânico durante a artrite experimental ($p < 0,05$). No ensaio da luciferase, a OCP e o AH reduziram significativamente a atividade da enzima luciferase ($p < 0,05$). Esta redução indica uma diminuição na atividade do NF- κ B. O comportamento nociceptivo foi reduzido pela OCP e pelo AH em ambas as fases da formalina em todas as doses testadas. As doses mais altas testadas exibiram inibições de $87 \pm 1\%$ e $72 \pm 4\%$, respectivamente, $p < 0,001$, na primeira fase, e $87 \pm 1\%$ e $81 \pm 2\%$, respectivamente, $p < 0,001$, na segunda fase. O tratamento oral com a OCP e com o AH (1, 3, 10 mg / kg) reduziu significativamente a resposta nociceptiva das contorções abdominais induzidas por ácido acético e a dose de 10 mg/kg foi a mais eficaz com inibições

máximas de $86 \pm 2\%$ e $82 \pm 1\%$, respectivamente, $p < 0,001$. A administração de OCP e AH (10 mg/kg) não afetou significativamente as latências de retirada da cauda dos camundongos em comparação com a morfina utilizada como controle. A administração concomitante de OCP e AH com naloxona afetaram as latências do movimento da cauda apenas parcialmente, tendo a naloxona antagonizado os efeitos da morfina. Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, tendo em vista que é escasso na literatura dados farmacológicos sobre a *Copaifera pubiflora* Benth. Outrossim, os achados farmacológicos apresentados sugerem que a OCP e o AH podem inibir a produção de citocinas inflamatórias pela supressão da via de sinalização do NF- κ B, resultando em atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas. Ainda, estes resultados contribuem para a confirmação das atividades farmacológicas atribuídas popularmente para a espécie, sendo que pela primeira vez observou-se que a oleorresina é efetiva para o tratamento de doenças inflamatórias, tornando a planta alvo para estudos mais aprofundados dos mecanismos de ação farmacológicos envolvidos, fornecendo subsídios para estudos posteriores que poderão servir ao desenvolvimento de um novo fitoterápico.

Palavras-chave: *Copaifera pubiflora*, ácido ent-hardwickiico, oleorresina

ABSTRACT

SÍMARO, G.V. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin and its major metabolite *ent*-hardwickiic acid**. 2021. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Copaifera species folkloric names are "copaíbas, copaibeiras, copaívas or oil stick", which are widely used in Brazilian folk medicine. Among all ethnopharmacological applications described for *Copaifera* spp oleoresins, their anti-inflammatory effect stands out. However, the knowledge of anti-inflammatory and antinociceptive properties of *Copaifera pubiflora* Benth is scarce. Therefore, we investigated the cytotoxic, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of *Copaifera pubiflora* oleoresin (OCP) and its major compound *ent*-hardwickiic acid (AH). The phosphatase assay was used to evaluate the cytotoxicity of OCP and AH in three different cell lines. OCP and AH doses of 1, 3, and 10 mg/kg were employed in the biological assays. The assessment of motor activity was performed using open-field and rotarod tests. Anti-inflammatory activity of OCP and AH was assessed through carrageenan-induced paw edema, carrageenan-induced hyperalgesia, measurement of INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α in a multi-spot system with the immortalized cell line THP-1, zymosan-induced arthritis, and luciferase assay. Formalin test and acetic acid-induced abdominal writhing were undertaken to evaluate the antinociceptive potential of OCP and AH. A tail-flick test was used to evaluate possible central OCP and AH actions. In the cytotoxicity evaluation, OCP and AH were not cytotoxic to the cell lines tested. OCP and AH (10 mg/kg) did not affect animals' locomotor capacity in both open-field and rotarod tests. AH and OCP significantly inhibited the carrageenan-induced paw edema, being the doses of 10 mg/kg the most effective, registering maximum inhibitions of $58 \pm 8\%$ and $76 \pm 6\%$ respectively, $p < 0.05$. Both AH and OCP significantly decreased the intensity of mechanical inflammatory hyper-nociception on carrageenan-induced hyperalgesia at all tested doses, and 10 mg/kg was the most effective dose with maximum inhibitions of $74 \pm 2\%$ ($p < 0.05$) and $76 \pm 3\%$ ($p < 0.01$), respectively. AH and OCP decreased INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α levels at 24 and 72 h in the multi-spot system. In zymosan-induced arthritis, OCP and AH decreased the number of neutrophils in arthritic mice joints and the number of total leukocytes ($p < 0.05$). In experimental arthritis, AH and OCP significantly decreased joint swelling ($p < 0.05$). OCP and AH also increased the mechanical threshold during experimental arthritis. In the luciferase assay, OCP and AH significantly reduced luciferase activity ($p < 0.05$). This reduction indicates a decrease in NF- κ B activity. OCP and AH reduced the nociceptive behavior in both phases of formalin at all tested doses. The highest doses tested displayed inhibitions of $87 \pm 1\%$ and $72 \pm 4\%$, respectively, $p < 0.001$, in the first phase, and $87 \pm 1\%$ and $81 \pm 2\%$, respectively, $p < 0.001$, in the second phase. Oral treatment of OCP and AH (1, 3, 10 mg/kg) significantly reduced the nociceptive response in acetic acid-induced abdominal writhings, and the 10 mg/kg dose was the most effective with maximum inhibitions of $86 \pm 2\%$ and $82 \pm 1\%$, respectively, $p < 0.001$. The concomitant administration of OCP and AH with naloxone affected the tail movement latencies only partially. On the other hand, naloxone antagonized the effects of morphine. The results presented in this work are unprecedented, considering that pharmacological data on *Copaifera pubiflora* Benth is scarce in the literature. Furthermore, the pharmacological findings suggest that OCP and AH can inhibit the production of inflammatory cytokines by suppressing the NF- κ B signaling pathway, resulting in anti-

inflammatory and antinociceptive activities. Still, these results contribute to the confirmation of the pharmacological activities popularly attributed to the species. For the first time, it was observed that oleoresin is effective for treating inflammatory diseases, making it a target plant for further studies of the pharmacological mechanisms, providing subsidies for further studies that may help develop a new phytotherapeutic.

Keywords: *Copaifera pubiflora*, *ent-hardwickiic* acid, oleorresin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido <i>ent</i> -8(17)-13E-labdadieno-15-óico (ácido copálico), importante marcador químico da oleorresina das espécies de <i>Copaifera</i> .	4
Figura 2. Estruturas químicas dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos: (1) β -cariofileno, (2) α -copaeno, (3) α -humuleno, (4) β -bisaboleno, (5) α -selineno, (6) β -selineno, (7) δ -cadineno.....	4
Figura 3. Estrutura química do ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico, (ácido <i>ent</i> -hardwíckiico).....	7
Figura 4. Genes alvo do NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação. Adaptado de Chandrasekharan et al (2002).	15
Figura 5. Teste do campo aberto (<i>Open-field</i>).....	25
Figura 6. Equipamento Rota Rod	26
Figura 7. Teste do edema de pata induzido por carragenina.	27
Figura 8. Teste de estimulação mecânica na pata de camundongos com o monofilamento de Von Frey 0,6 g	28
Figura 9. Teste de retirada de cauda (<i>Tail-Flick</i>).....	32
Figura 10. Estrutura química do metabólito ácido <i>ent</i> -hardwíckiico	34
Figura 11. Efeitos da administração de diazepam (1 mg/kg), oleorresina de <i>Copaifera pubiflora</i> (10 mg/kg) e ácido <i>ent</i> -hardwíckiico (10 mg/kg) sobre a atividade locomotora dos animais nos testes campo aberto (A e B) e Rota Rod (C). Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste a posteriori de Dunnett (* p <0,01 e *** p <0,001).....	39
Figura 12. Efeitos anti-inflamatórios da OCP administrada por via oral (1, 3 e 10 mg/kg) (A), e do AH (1, 3 e 10 mg/kg) (B) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6) quando comparado com o controle.....	42
Figura 13. Efeitos da administração oral de indometacina (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg), OCP (1, 3 e 10 mg/kg) (A) e AH (1, 3 e 10 mg/kg) (B) na hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina (300 μ g, 20 μ L/pata) em camundongos. (C) Área sob a curva calculada 4 h após a indução com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni (* p <0,05 e ** p <0,01).....	45

Figura 14. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1β (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$p<0,05) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. 47

Figura 15. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF- γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$p<0,05 e \$\$p<0,01) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. 49

Figura 16. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$\$p<0,01 e \$\$\$p<0,001) e grupo LPS (&&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. 51

Figura 17. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF-α (pg/mL por ug/mL de

proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p < 0,05$ e \$\$\$ $p < 0,001$) e grupo LPS (& $p < 0,01$ e && $p < 0,001$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. 52

Figura 18. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p < 0,01$) e grupo LPS ($p < 0,05$ e & $p < 0,01$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni..... 54

Figura 19. Efeitos anti-inflamatórios *in vivo* do AH e da OCP. **(A)** Efeitos do AH e OCP sobre o edema das articulações. **(B)** Efeitos do tratamento com OCP e AH no número total de leucócitos na articulação de camundongos com artrite. **(C)** Número total de neutrófilos na articulação de camundongos artríticos após o tratamento com AH e OCP. **(D)** Efeitos do AH e OCP no limiar mecânico durante a artrite experimental. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ em comparação com zymosan (one-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). 56

Figura 20. Efeito do tratamento com AH nas concentrações de 30 µM **(A e B)** e OCP, nas concentrações de 60 µg/mL **(C e D)** no teste de atividade específica em NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzidos por LPS 1 µg/mL (ensaio de luciferase) e níveis de TNF-α. Cada barra representa a média com E.P.M. * $p < 0,05$, ** e *** $p < 0,001$ comparado ao controle (médio); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em comparação com DMSO. 58

Figura 21. Efeitos da administração de indometacina (10 mg/kg), morfina (5 mg/kg), oleorresina de *Copaifera pubiflora* (1, 3 e 10 mg/kg) e do ácido *ent-hardwíckiico* (1, 3 e 10 mg/kg) na injeção de formalina (2,5%; 20 µL/pata) em camundongos. **(A)** 0-5'; 1ª fase; dor neurogênica, **(B)** 15-30'; 2ª fase; dor inflamatória. Os dados representam

a média \pm E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste <i>a posteriori</i> de Dunnett (** $p < 0,001$).	60
Figura 22. Efeitos da administração de indometacina (10 mg/kg), OCP (1, 3 e 10 mg/kg) e AH (1, 3 e 10 mg/kg) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste <i>a posteriori</i> de Dunnett (***) $p < 0,001$.	62
Figura 23. Efeitos da administração de morfina (5 mg/kg), naloxona (1 mg/kg), OCP (1, 3 e 10 mg/kg) e AH (1, 3 e 10 mg/kg) por injeção de formalina (2,5%; 20 μ L/pata) em camundongos para resposta nociceptiva no teste de retirada de cauda. (A) Efeitos da OCP (1, 3 e 10 mg/kg), AH (1, 3 e 10 mg/kg) e morfina (5 mg/kg). (B) Efeitos da morfina (5 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg), OCP (10 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg) e AH (10 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg). Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste <i>a posteriori</i> de Bonferroni (* $p < 0,05$, e *** $p < 0,001$).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ^1H do AH (400 MHz, CDCl_3 , multiplicidade, J em Hz) ...	35
Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C do AH (100 MHz, CDCl_3).....	36
Tabela 3. Citotoxicidade da oleorresina de <i>Copaifera pubiflora</i> e do ácido <i>ent-hardwíckiico</i> nas linhagens celulares L929, CHO-k1 e THP-1.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OCP	Oleorresina de <i>Copaifera Pubiflora</i>
AH	Ácido <i>ent</i> -hardwíckiico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IC₅₀	Concentração inibitória média (50%)
ICAM-1	Molécula tipo-1 de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleucina-10
IL-12p40	Interleucina-12p40
IL-17	Interleucina-17
IL-1β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
NF-κB	Fator nuclear-kappaB
PBS	Tampão salino fosfato
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
VCAM-1	Molécula tipo-1 de adesão vascular
Nav1.7	Canal de sódio do controlado por voltagem 1.7
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido nítrico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
i.p.	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
DAMP	Padrão molecular associado a dano
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PGE₂	Prostaglandina E ₂
NOD	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
NLR	Receptores do tipo NOD

IKK	Complexo IκB quinase
IKKα	IκB quinase- α
IKKβ	IκB quinase- β
IKKγ	IκB quinase- γ
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>J</i>	Constante de acoplamento

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas medicinais no Brasil e a descoberta de substâncias bioativas	1
1.2 O gênero <i>Copaifera</i> e sua importância fitofarmacêutica	2
1.3 Potencial antinociceptivo e anti-inflamatório das oleorresinas de <i>Copaifera</i>	5
1.4 O ácido <i>ent-hardwíckiico</i> e seu potencial biológico	6
1.5 Inflamação – aspectos gerais.....	7
1.5.1 Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória	7
1.6 Papel do TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10 na regulação da resposta inflamatória.....	9
1.6.1 IL-1 β	9
1.6.2 TNF- α	10
1.6.3 IL-6.....	11
1.6.4 IL-8/CXCL-8.....	11
1.6.5 Interferon-gama (INF- γ).....	12
1.6.6 IL-10.....	13
1.7 Sinalização via NF- κ B	13
1.8 Nocicepção e dor	15
1.8.1 Mecanismos periféricos da transmissão sensorial	16
1.8.2 Dor Inflamatória.....	17
2- OBJETIVOS	19

2.1 Objetivos gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 – MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Autorização de pesquisa	20
3.2 Coleta da oleoresina de <i>Copaifera pubiflora</i>	20
3.3 Isolamento do ácido <i>ent-hardwíckiico</i>	20
3.4 Delineamento experimental.....	21
3.5 Animais	21
3.6 Manutenção das linhagens celulares	21
3.7 Ensaio de citotoxicidade in vitro	22
3.7.1 Delineamento experimental.....	22
3.7.2 Citotoxicidade por fosfatase ácida.....	23
3.7.3 Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929.....	23
3.7.4 Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada THP-1	24
3.8 Avaliação da atividade locomotora.....	24
3.8.1 Campo aberto – Open field	24
3.8.2 Rota Rod	25
3.9 Edema de pata induzido por carragenina.....	26
3.10 Avaliação da hiperalgesia mecânica através do monofilamento de Von Frey..	27
3.11 Determinação de interferon-gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em sistema multi-spot utilizando a linhagem celular imortalizada THP-1	28
3.12 Artrite induzida por zymozan	29
3.12.1 Determinação da hiperalgesia articular	29
3.12.2 Edema articular	29
3.12.3 Migração de neutrófilos	30
3.13 Atividade específica sobre NF- κ B em macrófagos RAW-264.7-Luc (Ensaio da luciferase).....	30

3.14 Avaliação da nocicepção espontânea produzida por formalina	31
3.15 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	31
3.16 Teste de retirada de cauda (Tail-flick)	32
3.17 Análise Estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Determinação estrutural do ácido <i>ent</i> -hardwíckiico.....	34
4.2 Avaliação do potencial citotóxico da oleorresina de <i>Copaifera pubiflora</i> e do ácido <i>ent</i> -hardwíckiico	37
4.3 Avaliação da atividade locomotora.....	38
4.4 Edema de pata induzido por carragenina.....	39
4.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica através do monofilamento de Von Frey....	43
4.6 Efeitos da OCP e do AH sobre a concentração de interferon-gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e em sistema multi-spot em células THP-1	46
4.7 Artrite induzida por zymozan	54
4.8 Atividade específica sobre NF- κ B em macrófagos RAW-264.7-Luc (Ensaio da luciferase).....	56
4.9 Avaliação da nocicepção espontânea produzida por formalina	58
4.10 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	61
4.11 Teste de retirada de cauda (Tail-flick)	62
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	90
ANEXO	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais no Brasil e a descoberta de substâncias bioativas

O uso de plantas medicinais talvez tenha sido uma das primeiras manifestações da humanidade em relação à busca de meios que pudessem aliviar suas dores e enfermidades. Estes vegetais têm sido utilizados na profilaxia e no tratamento de doenças que acometem os seres humanos. Nos dias de hoje os produtos naturais continuam sendo um importante recurso para o desenvolvimento tecnológico e socioeconômico e para a manutenção do bem-estar humano (LUCA et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016). Atualmente, o alto custo da descoberta de novos fármacos e moléculas através da síntese química fez com que as indústrias farmacêuticas voltassem sua atenção para as plantas medicinais, uma vez que suas atividades biológicas se devem aos metabólitos secundários por elas sintetizadas, os quais podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (PASA, 2015). Estima-se que entre 50% e 70% dos medicamentos atuais são derivados ou foram baseados em esqueletos químicos de moléculas isoladas de produtos naturais, e que o mercado global para essa classe de medicamentos atinja 20 bilhões de dólares anualmente (POSADZKI; WATSON; ERNST, 2013; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

O Brasil é um país que abriga uma das maiores biodiversidades vegetais do mundo e possui uma grande diversidade social com longa tradição relacionada ao uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças agudas e crônicas (RIBEIRO et al., 2018; SOUZA et al., 2013). Tal fato tem chamado a atenção de vários pesquisadores e de empresas farmacêuticas brasileiras afim de se estudarem as plantas medicinais nativas e seus princípios ativos (DUTRA et al., 2016). Nos últimos anos o Brasil tem aperfeiçoado as tecnologias envolvidas nesse campo de estudo. Entretanto, a utilização de plantas da flora nativa para fins medicinais ainda é realizada com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, bem como com ausência do conhecimento de seus constituintes químicos responsáveis por tais atividades (FERNANDES et al., 2017; PEDROLLO; KINUPP, 2015).

É importante mencionar que a legislação brasileira de fitoterápicos evoluiu muito em vários aspectos, o que era uma condição obrigatória para subir de patamar (BUFAINO, 2013). Atualmente, o desenvolvimento de fitomedicamentos no Brasil é pautado pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 26/2014, a qual determina a necessidade da comprovação da segurança, eficácia e qualidade de produtos vegetais antes de serem comercializados e utilizados pela população (BRASIL, 2014). Além disso, políticas públicas de apoio a pesquisa foram criadas: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). As aprovações dessas políticas facilitaram a criação de uma base técnica e teórica do uso de fitoterápicos no país, minimizando os problemas oriundos de seu uso indevido (ALENCAR, 1982; PIERI et al., 2012a; PONTES et al., 2003).

O desenvolvimento nacional de alguns fitomedicamentos modernos utilizando-se extratos vegetais padronizados, como por exemplo, o Acheflan® (*Cordia verbenacea*) e o Sintocalmy® (*Passiflora incarnata*), roborou uma nova perspectiva das indústrias nacionais em promover investimentos para agregar valores farmacológicos na biodiversidade vegetal do Brasil. Outrossim, tendências futuras que agreguem o conhecimento acadêmico proveniente de grupos de pesquisa em produtos naturais do Brasil com o empreendedorismo necessário para o crescimento das indústrias farmacêuticas nacionais, permitirão que o país ganhe maior destaque e projeção no que diz respeito a produção mundial de fitomedicamentos (SANTIAGO et al., 2015; SOUSA et al., 2011).

1.2 O gênero *Copaifera* e sua importância fitofarmacêutica

As árvores do gênero *Copaifera* merecem grande destaque no campo de produtos naturais derivados de plantas, por se tratarem de plantas medicinais comumente utilizadas pela população brasileira, em função de suas inúmeras aplicações farmacológicas historicamente comprovadas pela medicina popular (ARRUDA et al., 2019; SOUZA et al., 2013; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

As plantas do gênero *Copaifera*, pertencentes à família Leguminosae, são conhecidas popularmente como “copaíbas, copaibeiras, copaívas ou pau d’óleo” e ocorrem em regiões tropicais da América Latina (do México ao norte da Argentina), da África e da Ásia. Das 72 espécies conhecidas, o Brasil abriga cerca de 25,

principalmente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e na Região Amazônica. As espécies que ocorrem com maior abundância são: *C. langsdorffii*, *C. officinalis*, *C. guianensis*, *C. duckei*, *C. confertiflora*, *C. coriácea* e *C. cearensis* (ARRUDA et al., 2019; DA SILVA et al., 2017; DE S. VARGAS et al., 2015).

O valor biológico das copaíbas está em grande parte relacionadas ao uso de sua oleorresina, a qual é obtida por extração do tronco das árvores. A oleorresina é um produto do metabolismo secundário das árvores do gênero *Copaifera*, protegendo a planta contra fungos, animais e bactérias, sendo encontrado em canais secretores da árvore, majoritariamente no tronco (PIERI et al., 2012a; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

A oleorresina se apresenta como um líquido com cor e viscosidade variáveis, variando do amarelo ao marrom claro, composta por uma fase sólida ou resina com uma poção não volátil composta principalmente por diterpenos ácidos, e uma parte oleosa volátil, constituída por uma mistura de sesquiterpenos. As oleorresinas são amplamente utilizadas na medicina popular e a maioria dos estudos publicados são relacionados à sua composição química e atividades farmacológicas (ARRUDA et al., 2019; CARNEIRO et al., 2020). A variação na composição química das oleorresinas é influenciada por muitos fatores, tais como diferenças metabólicas entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies distintas, espécies botânicas, sazonalidade e tipo de plantio. Também podem ocorrer adulterações ao longo da cadeia produtiva (DA SILVA et al., 2017, 2020). Deste modo, a grande variedade metabólica encontrada em sua composição química as tornam valiosas fontes para a busca de novos metabólitos farmacologicamente promissores.

Já foram isolados e caracterizadas aproximadamente 45 diferentes estruturas químicas de diterpenos e identificados mais de 70 hidrocarbonetos sesquiterpênicos (LEANDRO et al., 2012). Os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno são considerados os marcadores químicos da fração sesquiterpênica (volátil) da oleoresina (NAKAMURA et al., 2017). Por outro lado, o ácido *ent*-8(17)-13E-labdadieno-15-óico (ácido *ent*-copálico) (**Figura 1**) é considerado o principal marcador do gênero (GOMES et al., 2010; SANTIAGO et al., 2015; VEIGA et al., 2007).

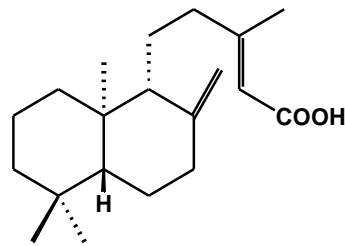


Figura 1. Estrutura química do ácido ent-8(17)-13E-labdadieno-15-óico (ácido copálico), importante marcador químico da oleorresina das espécies de *Copaifera*.

Além dos marcadores químicos β -cariofileno e óxido de cariofileno, os sesquiterpenos α -copaeno, α -humuleno, β -bisaboleno, α e β -selineno e o δ -cadieno (**Figura 2**) ocorreram em grande quantidade nos óleos analisados (DA SILVA et al., 2020; LEANDRO et al., 2012; SOUZA et al., 2011).

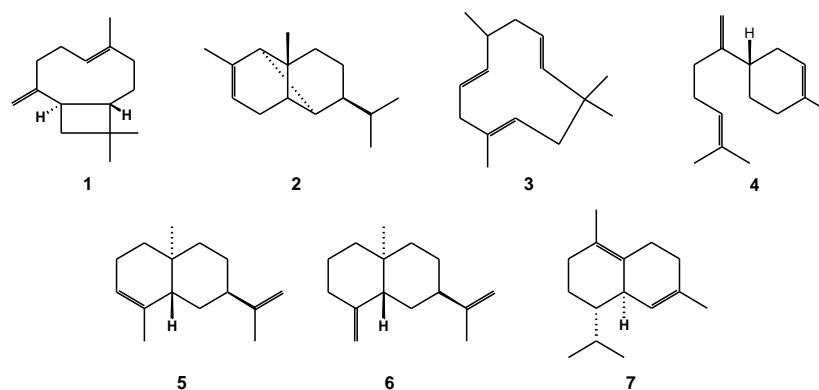


Figura 2. Estruturas químicas dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos: (1) β -cariofileno, (2) α -copaeno, (3) α -humuleno, (4) β -bisaboleno, (5) α -selineno, (6) β -selineno, (7) δ -cadineno.

No que diz respeito às atividades biológicas das *Copaiferas*, sabe-se que sua oleorresina possui propriedades medicinais bastante difundidas entre os índios latino-americanos. Relatos históricos denotam que este bálsamo era extensivamente utilizado como cicatrizante de feridas e úlceras, antitetânico, analgésico e anti-inflamatório (BASILE et al., 1988; BAYLAC; RACINE, 2003; FLORES et al., 2015; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Diversos grupos de pesquisa têm realizado estudos científicos que comprovam a eficácia farmacológica destes bálsamos (ARRUDA et al., 2019; LEANDRO et al., 2012). Alguns estudos tem validado as atividades farmacológicas das oleorresinas, como: propriedade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, leishmanicida, quimiopreventiva,

tripanocida, antimicrobiana, cicatrizante e gastroprotetora. (ALBUQUERQUE et al., 2017; BEZERRA CARVALHO et al., 2014; GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2003; SENEDESE et al., 2019; TAPPIN et al., 2004; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Contudo, as atividades analgésicas e anti-inflamatórias são as mais pesquisadas, dado seu histórico uso popular pelas comunidades indígenas (AMES-SIBIN et al., 2018; GOMES et al., 2007; PINHEIRO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; SÍMARO et al., 2020; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

1.3 Potencial antinociceptivo e anti-inflamatório das oleorresinas de *Copaifera*

Os primeiros estudos realizados com a finalidade de avaliar a atividade anti-inflamatória das oleorresinas de copaíba foram realizados por Basile et al (1988) e posteriormente, por Veiga-Júnior e Pinto (2002). Este último demonstrou tal atividade utilizando oleorresinas de diferentes espécies de *Copaifera* e fazendo o uso de diferentes agentes flogísticos. Baylac e Racine (2003) também encontraram resultados importantes com a oleorresina de *Copaifera officinalis*, quando foi observada a inibição da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) que exerce um importante papel no processo inflamatório. Além disso, através do teste de edema de pata induzido por carragenina e por bradicinina, Veiga-Júnior et al (2007) observaram significativa atividade anti-inflamatória da oleorresina de *Copaifera multijuga*. Pinheiro et al (2017) encontraram inibições significativas de mediadores pró-inflamatórios na espécie relacionada *C. multijuga*, o que também foi relatado na etnomedicina para o tratamento de doenças inflamatórias.

Em relação à atividade antinociceptiva, as oleorresinas de *C. reticulata* e *C. multijuga* apresentaram possível atividade central e periférica. Além disso, a oleorresina de *C. duckei* também mostrou atividades antinociceptivas promissoras (GOMES et al., 2007). Ademais, nosso grupo de pesquisa também demonstrou recentemente que a oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth possui promissoras atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (SÍMARO et al., 2020).

Apesar dos trabalhos científicos acima descritos validarem o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo das oleorresinas de *Copaifera*, deve-se salientar que estes estudos foram realizados apenas com o bálsamo bruto e com frações obtidas por processos cromatográficos. De uma maneira geral, esta abordagem farmacológica não permite identificar o(s) metabólito(s) ativo(s) responsável(is) pela

sua atividade, dificultando assim, a completa validação farmacológica deste recurso natural, bem como o estudo do mecanismo de ação e dos parâmetros toxicológicos da(s) substância(s) ativa(s) que são de extrema importância para o desenvolvimento dos fitomedicamentos modernos.

1.4 O ácido *ent*-hardwíckiico e seu potencial biológico

Os terpenoides constituem a maior classe de produtos naturais. Os diterpenos correspondem a um grande grupo de substâncias com 20 átomos de carbono, derivados do pirofosfato de geranylgeraniol. Sua estrutura química pode ser linear, bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (primaranos, abietanos) e tetracíclicos (giberelanos, kauranos) (LI; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016; NEWMAN, 1973). O ácido *ent*-hardwíckiico (ácido *ent*-15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico), (**Figura 3**), é um diterpeno do tipo clerodano muito abundante nas oleorresinas de copaíbas. Estudos fitoquímicos realizados com a oleorresina de *Copaifera pubiflora* reportaram o teor de 26% de ácido *ent*-hardwíckiico nessa espécie (DA SILVA et al., 2017; LEANDRO et al., 2012).

Nos últimos anos, os estudos de várias espécies levaram ao isolamento de um grande número de terpenos que possuem variadas propriedades farmacológicas, como atividades anti-inflamatória, antibacteriana, leishmanicida, dentre outras (ARRUDA et al., 2019; CARNEIRO et al., 2020; PIERI et al., 2012b; PRISINZANO; ROTHMAN, 2008; RIBEIRO et al., 2018).

O ácido *ent*-hardwíckiico (ácido *ent*-15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico), (**Figura 3**), é um diterpeno do tipo clerodano muito abundante nas oleorresinas de copaíbas (LEANDRO et al., 2012). Alguns estudos realizados com este metabólito demonstraram uma significativa atividade antibacteriana, antifúngica e leishmanicida (CARNEIRO et al., 2020; CRENTSIL et al., 2020; DE S. VARGAS et al., 2015). Além disso, o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido *ent*-hardwíckiico foi recentemente descrito (CAI et al., 2019; DE S. VARGAS et al., 2015).

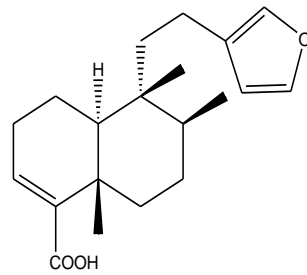


Figura 3. Estrutura química do ácido ent-15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico, (ácido *ent*-hardwíckiico).

1.5 Inflamação – aspectos gerais

A reação inflamatória é uma resposta do tecido vascularizado a estímulos lesivos (físicos, químicos ou mecânicos), caracterizada por uma ação de ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios no tecido residente. Essa resposta envolve eventos celulares e bioquímicos de alta complexidade, incluindo o extravasamento de fluidos, ativação de receptores, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo celular. Sabe-se que uma resposta inflamatória controlada é benéfica (por exemplo, na proteção contra infecções). Entretanto, pode-se tornar prejudicial se ocorrer de forma desregulada (por exemplo, causando choque séptico ou inflamação crônica). Desta forma, mecanismos que seriam designados para destruir agentes invasores, quando não adequadamente controlados, podem danificar tecidos saudáveis, tornando-se causa de injúria e doença (ZHANG et al., 2010; BRADLEY et al., 2015)

À nível tecidual, a inflamação é caracterizada por vermelhidão (rubor), edema, calor, dor e perda da função tecidual, que resultam de respostas locais de células imunes e vasculares a infecção ou lesão (KOTAS; MEDZHITOV, 2015; MEDZHITOV, 2008).

1.5.1 Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória

Os eventos microcirculatórios importantes que ocorrem durante o processo inflamatório incluem: alterações de permeabilidade vascular, recrutamento e acúmulo de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios (BASBAUM et al., 2009; LE

BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; MERTENS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009). A inflamação também pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos estéreis (não infecciosos), como toxinas, isquemia, trauma, corpos estranhos, dentre outros. Deste modo, mediante dano físico ou lesão tecidual, ocorre a exposição de moléculas intracelulares conhecidas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Algumas moléculas endógenas têm sido descritas, como o grupo de proteínas com alta mobilidade-B1 (HMGB-1), trifosfato de adenosina (ATP) e S100 (BOURS et al., 2006; ZHANG et al., 2010). A “inflamação estéril” ocorre mediante o reconhecimento de tais moléculas por receptores específicos de células do sistema imune inato (CHEN; NUÑEZ, 2010; ZHANG et al., 2010).

Um dos maiores estimuladores da inflamação é a infecção, que pode ser causada por uma série de microrganismos patogênicos como vírus, bactérias e fungos. A resposta inflamatória induzida por infecção conta com a participação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (BRADLEY et al., 2015; HONORE et al., 2002; SALTER, 2005). Tais receptores tem a capacidade de efetuar o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e algumas moléculas endógenas (DAMPs) (FÜRST, 1999). Exemplos de PAMPs são os componentes da parede celular bacteriana como: Peptidoglicano (PGN), Lipopolissacarídeos (LPS), ácido lipoteicoico além de algumas lipoproteínas (KOTAS; MEDZHITOV, 2015; MEDZHITOV, 2008).

O reconhecimento de um PAMP é feito por receptores que estão presentes em células do sistema imune, levando a ativação celular e estimulando a produção e secreção de mediadores inflamatórios como: citocinas, eicosanoides, quimiocinas e aminas vasoativas. Dentre os principais PRRs conhecidos destacam-se os receptores do tipo Toll (TLR), receptores do tipo NOD :domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NLRs: NOD-like receptors), receptores de lectina do tipo C, receptores do tipo RIG-1: ácido retinóico indutível do gene 1 (RLRs: RIG-1-like receptors) e receptores do tipo AIM2: ausente na melanoma 2 (ALRs: AIM2-like receptors) (PLATNICH; MURUVE, 2019; SANTONI et al., 2015; SCHAEFER, 2014; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Como resultado, os PRRs ativam as vias de sinalização inflamatória para induzir a imunidade inata (SANTONI et al., 2015).

O reconhecimento inicial de uma infecção é mediado por macrófagos e mastócitos residentes no tecido, resultando na liberação de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que inclui a interleucina -1 β (IL-1 β), fator de necrose

tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-12 (IL-12), que são moduladores chave da gênese do processo inflamatório (MILLAN, 2002; SCHAIBLE, 2007; WILLIS, 2007). Em contrapartida, a interleucina-10 (IL-10) liberada por macrófagos tem papel regulador, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios. A ativação de macrófagos também leva à produção de grandes quantidades de quimiocinas, que por sua vez, irão exercer uma função reguladora na migração de monócitos, neutrófilos e linfócitos (TURNER et al., 2014). Deste modo macrófagos e mastócitos secretam as quimiocinas KC/CXCL1 e a CXCL2 (MIP-2) que irão exercer suas ações quimiotáticas, auxiliando na resposta neutrofílica (DE FILIPPO et al., 2013). Como consequência, o principal efeito dos mediadores pró-inflamatórios é induzir um exsudato inflamatório local onde os leucócitos (principalmente neutrófilos) e as proteínas plasmáticas terão acesso aos tecidos extravasculares através de vênulas pós-capilares (DUTRA et al., 2013; LI et al., 2003).

1.6 Papel do TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10 na regulação da resposta inflamatória.

1.6.1 IL-1 β

Essas citocinas são expressas principalmente por macrófagos, monócitos e células dendríticas. Para a produção e liberação da IL-1 β são necessários dois fenômenos distintos: 1) a ativação do receptor TLR, resultando na indução da pro-IL-1 β e conseqüentemente em sua síntese que por sua vez ocorre principalmente via fator nuclear-kappaB (NF- κ B), 2) pela ativação de um complexo celular multiproteico denominado de inflamassoma, que irá ativar proteases da família das caspases (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Um dos inflamassomas que tem sido descrito como particularmente importante para a ativação da IL-1 β é denominado de NLRP3 ou NALP3. A ativação desse complexo culmina na ativação da caspase-1, que é uma das mais importantes cisteínas proteases responsáveis por clivar a pro-interleucina IL-1 β em sua forma biologicamente ativa (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; SCHAIBLE, 2007).

A IL-1 β irá promover efeitos biológicos locais e sistêmicos. Esses efeitos serão mediados através da ligação da IL-1 β a seu receptor de membrana chamado receptor tipo-1 de IL-1 (IL-1R1) (BURGESS et al., 2002; GEBHART, 2004; PORRECA;

OSSIPOV; GEBHART, 2002; STEEDS, 2013). O domínio funcional do componente citosólico de IL-1R1 é denominado de TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*). Esse domínio compartilha alta homologia com os domínios TIR encontrados nos receptores do tipo Toll (TLR). Portanto, respostas inflamatórias fundamentais como a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B também pode ocorrer mediante a estimulação do receptor de IL-1 (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002).

Com relação aos efeitos biológicos, a IL-1 β promove o recrutamento de células até o sítio da inflamação. Essa citocina também induz a produção de enzimas como: fosfolipase A2, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), acarretando na liberação de mediadores inflamatórios como a prostaglandina E₂ e óxido nítrico (NO), contribuindo com a resposta inflamatória local e sistêmica (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010; VEZZANI; VIVIANI, 2015).

1.6.2 TNF- α

O TNF- α é liberado após a ocorrência de processos inflamatórios e/ou danos celulares. Esse mediador é produzido por macrófagos, monócitos, células *natural killers* (NK) e Linfócitos T ativados. A produção do TNF- α é regulada transcricionalmente pelo NF- κ B, proteína ativadora tipo-1 (AP-1), c-Jun e fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002; SATOR-KATZENSCHLAGER, 2014). O TNF- α liga-se a dois tipos de receptores, o TNFR1 e o TNFR2. A ligação do TNF- α a seu receptor pode contribuir com a ativação do NF- κ B, que é um fator de transcrição que controla uma grande quantidade de genes inflamatórios. Além disso a interação do TNF- α com seu receptor TNFR1 também tem a capacidade de regular eventos apoptóticos (BALIKI et al., 2010; FIELDS, 2004; LABUZ et al., 2015).

Fisiologicamente, a ativação do TNF- α induz o metabolismo do ácido araquidônico, dando origem aos leucotrienos e prostaglandinas. Além disso o TNF promove a diferenciação de monócitos/macrófagos, aumenta a proliferação de linfócitos B ativados, induz a proliferação de fibroblastos, aumenta a expressão de moléculas de adesão como a molécula tipo-1 de adesão intercelular (ICAM-1), E-selectina e a molécula tipo-1 de adesão vascular (VCAM-1) e auxilia na migração celular (principalmente neutrófilos) induzindo a síntese de várias quimiocinas. O TNF- α também é um potente indutor de IL-6, IL-1, IL-18 e GM-CSF. Outrossim, o TNF- α é

considerado um dos maiores indutores da inflamação (BRADLEY, 2008; PAGE; BESTER; PRETORIUS, 2018; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

1.6.3 IL-6

A IL-6 é um mediador solúvel produzido principalmente por hepatócitos. Ao ser secretada a IL-6 se liga ao seu receptor- α (IL-6R). Esse mediador induz a síntese de proteínas da fase aguda como a proteína C-reativa (PCR), proteína amiloide sérica A (PAS), fibrinogenio e haptoglobina (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Caso a resposta de fase aguda for mantida por um tempo prolongado, com níveis elevados de IL-6 que levaria a altas concentrações de PAS, podem ocorrer complicações graves relacionadas a inflamação crônica. A deposição de fibrilas de amiloide causa deterioração progressiva em vários órgãos. A IL-6 também está envolvida na regulação dos níveis séricos de ferro e zinco por meio do controle de seus transportadores, isso pode gerar complicações como hiperzincemia e anemias associadas a inflamação crônica (GILLMORE et al., 2001; LIUZZI et al., 2005).

Seus efeitos relacionados a migração celular incluem: alteração do recrutamento de neutrófilos por monócitos suprimindo quimiocinas atraentes para polimorfonucleares como CXCL8 (IL-8), CXCL1e CX3CL1, aumentando a liberação de quimiocinas atrantes de monócitos, como CCL8, CCL2, CXCL5 e CXCL6 (CHAPMAN; TUCKETT; SONG, 2008; KRAYCHETE; GOZZANI; KRAYCHETE, 2008; KUNER, 2010). Em combinação com o fator de crescimento tumoral- β (TGF β) induz a diferenciação de células Th-17 (BETTELLI et al., 2006; KORN et al., 2009). A IL-6 também induz a expressão do receptor do fator estimulante de colônia monócito (M-CSF), promovendo a diferenciação de monócitos para macrófagos no sítio da inflamação. Além disso, a IL-6 juntamente com o TNF e a IL-1 β , estimulam a produção de quimiocinas que levam a ativação de fagócitos (FALEIRO et al., 2014; KAPLANSKI et al., 2003; LIUZZI et al., 2005).

1.6.4 IL-8/CXCL-8

Dentre as classes das citocinas existe a superfamília das quimiocinas, que são pequenas moléculas de baixo peso molecular com a capacidade de promover

ativação celular e quimiotaxia. Além disso, também atuam na proliferação, maturação, apoptose e diferenciação celular (RUSSO et al., 2014; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

Os efeitos biológicos da IL-8 são mediados através da ligação desse mediador com seus receptores CXCR1 e CXCR2. A IL-8 é considerada um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos em respostas inflamatórias, além de regular suas funções efetoras antimicrobianas através da geração de superóxido e de peróxido de hidrogênio, liberando enzimas lisossomais (DE OLIVEIRA et al., 2013; HERBOLD et al., 2010; WALZ et al., 1987). Além disso, a IL-8 tem propriedade quimioatraente de linfócitos T e atividade angiogênica. A IL-8 pode ser liberada por uma variedade de células após estimulação apropriada, incluindo monócitos, linfócitos T, fibroblastos, células tumorais, células epiteliais, hepatócitos, macrófagos e células sinoviais. Sua expressão é regulada principalmente pelo NF- κ B e ocorre em neutrófilos, monócitos, linfócitos T CD8⁺, mastócitos, basófilos e células *natural killer* (RIBEIRO et al., 2000).

1.6.5 Interferon-gama (INF- γ)

Uma vez que a inflamação é iniciada, o IFN- γ é produzido e atua por meio de várias moléculas e vias do sistema imunológico a fim de intensificar o processo inflamatório. Essa citocina é produzida predominantemente por células *natural killer* (NK), linfócitos T CD4⁺ Th1 e T CD8⁺ citotóxicos (GILCHRIST; BEFUS, 2008).

Os macrófagos e células dendríticas ativados na fase inicial da resposta imune inata produzem altas quantidades de IL-12. A IL-12 por sua vez, estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e promove a diferenciação de linfócitos CD4⁺ para Th1 que é produtor de IFN- γ (FENIMORE; YOUNG, 2016; MÜLLER et al., 2017).

Biológicamente, o IFN- γ tem a capacidade de interagir com linfócitos B induzindo a produção de anticorpos IgG opsonizantes, ativa macrófagos, estimula a produção de NO, estimula o aumento da expressão do complexo maior de histocompatibilidade classe I e II (MHC-I e MHC-II), ativa moléculas de adesão, induz moléculas co-estimuladoras (B7 e CD40) além de aumentar a atividade de quimiocinas, incluindo a IL-8 e a CCL1 (DENZLINGER et al., 1985).

1.6.6 IL-10

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina crucial para a regulação adequada da resposta inflamatória. Essa citocina pode ser produzida por várias células imunes ativadas, incluindo linfócitos B, mastócitos, granulócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), macrófagos, células dendríticas e vários subconjuntos de linfócitos T. Suas ações principais são consideradas anti-inflamatórias, uma vez que a IL-10 afeta o controle da fase resolutiva da inflamação por meio de mecanismos autócrinos e parácrinos (O’GARRA et al., 2008). A sinalização da IL-10 ocorre mediante interação com o receptor IL-10R. As ações imunossupressoras da IL-10 ocorrem majoritariamente limitando as ações pro-inflamatórias das células dendríticas e dos macrófagos. À nível celular a IL-10 atua como um agente regulador pós-transcricional, suprimindo a proteína HuR (antígeno humano R) que é estabilizadora do do RNA mensageiro (mRNA) de citocinas pro-inflamatórias (KOSTER; MCGREGOR; MACKANESS, 1971). A IL-10 também promove a ativação de macrófagos M2, que diferentemente dos macrófagos M1, irão atuar promovendo respostas anti-inflamatórias. Os macrófagos M2 irão auxiliar no reparo do tecido, estimulando a formação de uma nova matriz extracelular, promover a produção de colágeno e fibrose (ALON et al., 1996; ROSEN, 1993).

1.7 Sinalização via NF- κ B

A via de sinalização do fator nuclear-kappaB (NF- κ B) é uma importante via da imunidade inata e é crucial para a modulação da resposta inflamatória e proliferação celular (APLIN et al., 1998; VESTWEBER, 2000). O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição que apresentam homologia estrutural e que regulam uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos do sistema imunológico e inflamatório. Essa família é composta por cinco membros, incluindo NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel (SUN; CHANG; JIN, 2013; ZHANG; SUN, 2015).

O NF- κ B apresenta-se em sua forma inativada ligada a inibidores presentes do citoplasma, denominados inibidores- κ -B (I κ B), formando um complexo inativo no citoplasma. A ativação do NF- κ B envolve dois principais mecanismos de sinalização: o canônico e o não-canônico. Ambos são importantes na regulação da resposta imune

e inflamatória, porém possuem diferenças em seus mecanismos de sinalização (BASBAUM et al., 2009; BURNS et al., 2014). A via de sinalização canônica ocorre mediante a resposta a diversos estímulos, incluindo ligantes de vários receptores de citocinas, PRRs e sinalização de receptores de linfócitos T e B (TCR e BCR respectivamente). A ativação do NF- κ B por essa via envolve a degradação do I κ B pelo complexo trimérico I κ B quinase (IKK), que é composto das subunidades IKK α , IKK β e IKK γ (CUNHA et al., 2005). Essa degradação resulta na liberação de subunidades NF- κ B ativadas (predominantemente os dímeros p50/RelA e p50/c-Rel) que translocam para o núcleo onde ocorrerá a ligação com sequências específicas de DNA, que resultará em ativação ou repressão da transcrição (BARON, 2006; KRAYCHETE; GOZZANI; KRAYCHETE, 2008; SALTER, 2005).

A via não-canônica do NF- κ B responde seletivamente a um grupo específico de estímulos, incluindo ligantes de um subgrupo de membros da superfamília do receptor de TNF (TNFR), como LT β R, BAFFR, CD40 e RANK (MACGLASHAN, 2003). A ativação por essa via não envolve a degradação do I κ B, mas depende do processamento da proteína p100, que é precursora do NF- κ B2. A indução da NF- κ B quinase (NIK) resulta na cooperação funcional com o IKK α , mediando a fosforilação e processamento da p100, resultando no NF- κ B2 (p52) e sua translocação para o núcleo onde promoverá transcrições através da interação com o DNA (HERBERT; JUST; SCHMIDT, 2001). Acredita-se que o mecanismo canônico esteja relacionado com praticamente todas as respostas imunológicas, enquanto o mecanismo não-canônico está envolvido na regulação de funções específicas do sistema imunológico adaptativo (HERBERT; JUST; SCHMIDT, 2001).

Na resposta inflamatória aguda ocorre a ativação da via canônica do NF- κ B mediante a sinalização dos PRRs, que induzirá a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e mediadores inflamatórios (**Figura 4**). Nos macrófagos o NF- κ B é um fator de transcrição chave, sendo necessário para indução de um grande número de genes inflamatórios, incluindo aqueles que codificam IL1- β , TNF- α , IL-6, IL-12p40, ciclooxigenase-2 (COX-2) dentre outros (GOADSBY; LIPTON; FERRARI, 2002). O NF- κ B também promove o aumento de expressão de moléculas de adesão e aumento da migração de neutrófilos (MANCINI et al., 2001). Além disso, estudos recentes tem demonstrado que o NF- κ B também participa da expressão de genes anti-inflamatórios e da indução à apoptose, sendo importante na fase de resolução do processo inflamatório (MANCINI et al., 2001; TANIKAWA et al., 2002).

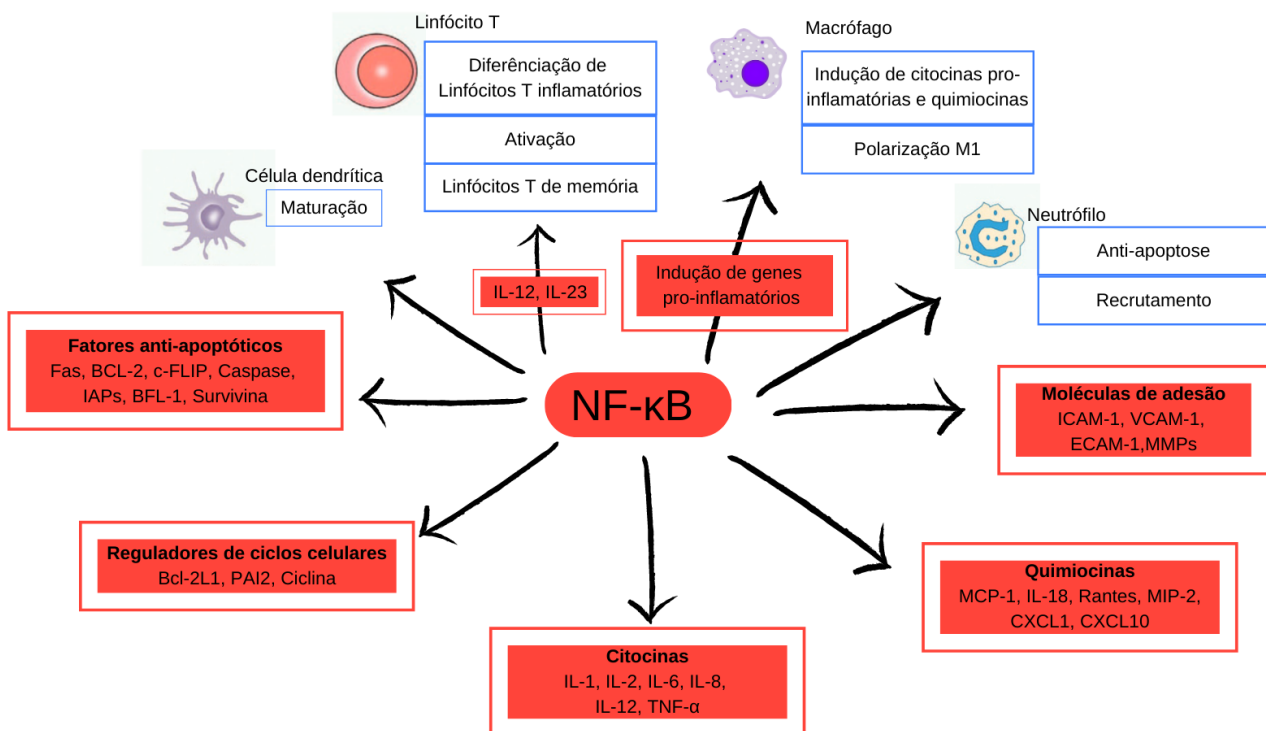


Figura 4. Genes alvo do NF-κB envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação. Adaptado de Chandrasekharan et al (2002).

1.8 Nocicepção e dor

O sistema sensorial, não é somente responsável pelo processamento dos estímulos provenientes do meio ambiente externo e interno do organismo, como também desempenha o papel de detectar e desencadear reações frente a esses meios. Esse sistema capacita o indivíduo à nocicepção e a dor. Em termos fisiológicos há diferença entre nocicepção e dor. A nocicepção está relacionada a manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo, enquanto a dor envolve um estímulo potencialmente nocivo, possui conotação individual e é representada por experiências subjetivas, as quais incluem fatores afetivos, emocionais e sociais (POSADAS et al., 2004). A relação entre a ativação de nociceptores e a percepção da dor envolve um complexo processamento pelas vias sensoriais, sendo característico de cada indivíduo, o que dificulta a sua compreensão e o seu tratamento clínico (MISCHKOWSKI et al., 2019).

A dor é definida pela Associação Internacional do Estudo da Dor (do inglês *International Association for the study of pain – IASP*) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial”. Por outro lado, a nocicepção depende de neurônios especializados, chamados nociceptores, que detectam e respondem estímulos potencialmente prejudiciais como: calor, mecânico e químico. Os corpos celulares dos neurônios nociceptores são encontrados no sistema nervoso periférico na raiz dorsal e nos gânglios trigêmeos. O nociceptor conduz a informação através de fibras sensoriais para o cérebro por meio de vias neuronais ascendentes, onde a informação pode ser percebida como dor (DENZLINGER et al., 1985).

1.8.1 Mecanismos periféricos da transmissão sensorial

Os nociceptores respondem a diversos estímulos que se iniciam na periferia (pele, articulações e vísceras), e através de fibras sensoriais conduzem essa informação até o corno dorsal da medula espinhal (SMITH, 1992).

No sistema nervoso sensorial periférico a informação é conduzida através das fibras A β , A γ e fibras C. Essas terminações periféricas são divididas de acordo com o papel exercido pelas fibras na transdução da informação sensorial, velocidade de condução, diâmetro e espessura de mielinização. A maioria das fibras A β respondem a estímulos mecânicos não nocivos de baixo limiar, possuem diâmetro largo (> 10 μ m) e são densamente mielinizadas, apresentando alta velocidade de condução do potencial de ação. Os corpos celulares de diâmetro pequeno e médio dão origem a maioria dos nociceptores, incluindo as fibras C não mielinizadas e as fibras A γ (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). As fibras A γ possuem um pequeno diâmetro (2 – 6 μ m), são pouco mielinizadas e são responsáveis pela condução dos estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos com uma velocidade intermediária. As fibras C são não mielinizadas e representam as fibras de menor diâmetro (0,4-1,2 μ m), apresentando uma baixa velocidade de condução. A maioria dos nociceptores de fibra C são polimodais, uma vez que essas fibras respondem a estímulos nocivos mecânicos e térmicos (acima de 43°C) (BASBAUM et al., 2009; HUNT; ROSSI, 1985; MILLAN, 1999; MISCHKOWSKI et al., 2019).

Frente a um estímulo, o sinal nocivo externo é traduzido em atividade elétrica e os potenciais de ação são conduzidos pelas fibras sensoriais até o corno dorsal da

medula espinhal, no corno dorsal da medula espinhal, os neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que formam as vias ascendentes (TONG; MACDERMOTT, 2014). Os neurônios aferentes primários liberam no corno dorsal da medula substâncias que estão envolvidas na modulação e transmissão da resposta nociceptiva para o SNC. Dentre essas substâncias, destacam-se a substância P (SP), glutamato, peptídeo relacionado ao gene de calcitonina e o óxido nítrico (SAHBAIE et al., 2010; WOZNIAK et al., 2012).

Os neurônios de segunda ordem projetam-se para estruturas supra espinhal onde transmite a informação por diferentes tratos nervosos, incluindo os tratos espino-talâmico, epinoreticulotalâmico e espinomesencefálico, até o tálamo, onde ocorre o processamento do componente sensorial e discriminativo da dor, refletindo assim, a origem da dor, sua localização, duração e intensidade (BASBAUM; JESSEL, 2000; HUNT; MANTYH, 2001).

1.8.2 Dor Inflamatória

A resposta inflamatória é normalmente desencadeada por um trauma ou lesão periférica. Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de mediadores químicos por células residentes no tecido lesionado (ZHANG et al., 2010).

Dentre os mediadores nociceptivos podemos destacar o TNF- α , IL-6, IL-1 β , leucotrienos e as aminas simpatomiméticas (noradrenalina e dopamina), que desempenham um papel direto na geração e manutenção da dor, facilitando a sensibilização central e hiperalgesia. Ademais, mediante a lesão, ocorre a liberação do ácido araquidônico, que subsequentemente, é convertido em prostanoídes através da ação das enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). A ação da enzima COX-2 no ácido araquidônico dá origem a prostaglandina E₂ que irá aumentar a sensibilização dos nociceptores através de sua ligação com o receptor de prostaglandina (EP) (BURIAN; GEISSLINGER, 2005). Tal sensibilização resulta em um processo hiperalgésico, ou seja, ocorre um aumento na sensação dolorosa (WINTER, 1962). A IL-1 β também pode induzir hiperalgesia mecânica, uma vez que a ativação da caspase-1 induz sua maturação local e conseqüentemente à indução da COX-2 e produção de PGE₂ (COLLIER et al., 1968; KOSTER; ANDERSON; DEBEER, 1959).

Outro mediador liberado durante o processo inflamatório é a bradicinina. Esse mediador se liga em receptores localizados em todos os tecidos, incluindo os receptores de bradicinina 2 que são expressos constitutivamente em neurônios, induzindo hipernocicepção mecânica por meio de uma cascata de citocinas liberadas por células residentes ou migrantes (CUNHA et al., 2005). A desgranulação de mastócitos residentes também pode desencadear nocicepção, tanto por meio da interação direta com os terminais nervosos periféricos, quanto indiretamente por meio de liberação de histamina, bradicinina e outros mediadores vasodilatadores (HOFMAN et al., 2016). Desse modo a inibição de um ou mais desses mediadores pode resultar na redução do processo nociceptivo e atenuação do processo inflamatório.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth, bem como de seu metabólito majoritário, o ácido *ent*-hardwíckiico por meio de ensaios farmacológicos específicos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o metabólito secundário ácido *ent*-hardwíckiico da oleorresina de *Copaifera pubiflora* utilizando-se da cromatografia líquida à vácuo (CLV) e cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a identificação da estrutura deste metabólito por meio de análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional e bidimensional de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica da OCP e do AH, frente a duas linhagens celulares normais (L929 e CHO-k1) e uma linhagem tumoral (THP-1), utilizando-se o método da fosfatase ácida;
- Avaliar a atividade motora dos animais, através do teste do campo aberto (*open-field*) e Rota Rod;
- Avaliar o efeito antiedematogênico da OCP e do AH e sobre a hipernocicepção inflamatória através dos testes de edema de pata induzido por carragenina e hiperalgesia induzida por carragenina;
- Identificar os efeitos do AH e da OCP sobre a liberação dos mediadores INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em sistema *multi-spot* utilizando a linhagem celular imortalizada THP-1
- Analisar o efeito do AH e da OCP sobre o edema articular, hiperalgesia articular e migração de neutrófilos, utilizando o método da artrite induzida por zymozan;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da OCP e do AH através dos testes de formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Avaliar possíveis efeitos centrais da OCP e do AH utilizando o teste de retirada de cauda (*Tail-flick*).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Autorização de pesquisa

Para a realização de estudos científicos com espécies vegetais da biodiversidade brasileira recebemos a autorização do Conselho Brasileiro de Autorização e Informação em Biodiversidade (SIBIO/ICMBio/MMA/BRASIL) e da Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA/BRASIL) sob os números 35143-1 e 010225/2014-5, respectivamente.

3.2 Coleta da oleorresina de *Copaifera pubiflora*

A coleta da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth foi realizada pelo Dr. Jonas Joaquim Mangabeira da Silva, no município de Mucajaí, RR (N 02° 36.205' W 060° 56.767'). A taxonomia botânica foi confirmada pela Dra. Silvane Tavares Rodrigues, da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, Amazônia Oriental, EMBRAPA, Belém, PA, onde um exemplar de voucher (número 180231) foi preservado para referência.

Para a coleta da oleorresina utilizou-se um perfurador manual (trado, medindo 1,2 m de comprimento e 2 cm de diâmetro). As árvores possuíam diâmetro acima de 30 cm, sendo que o orifício realizado atingiu o centro do interior do tronco e foi realizada a uma altura de cerca de um metro acima do solo (DA SILVA MEDEIROS; VIEIRA, 2008).

3.3 Isolamento do ácido *ent-hardwickiico*

O isolamento do ácido *hardwickiico* a partir da oleoresina de *C. pubiflora* foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia da Universidade de Franca em colaboração com a Doutoranda Luiza Junqueira. Para tanto 100 g de oleorresina de *C. pubiflora* foram submetidos à cromatografia líquida a vácuo (18 x 25 cm), resultando em 9 frações. A fração 3 (44.5 g) foi submetida novamente a cromatografia líquida a vácuo, obtendo-se 12 frações. A fração 12 apresentou pureza cromatográfica (> 95%) avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência-DAD e

foi então submetida a análise por Ressonância Magnética Nuclear. A identidade do composto foi confirmada como o ácido *ent*-hardwíckiico resultando em 5.9 g de composto puro, dentre os quais, 1,7 g foram utilizados para avaliação das atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias.

3.4 Delineamento experimental

Para a avaliação dos efeitos farmacológicos *in vivo* da OCP e do AH foram empregados diferentes protocolos com base nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da resposta inflamatória. As doses empregadas para este estudo foram de 1, 3 e 10 mg/kg da OCP e do AH, as quais foram estabelecidas com base na literatura e em estudos prévios realizados na Universidade de São Paulo – USP (ARRUDA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018; SÍMARO et al., 2020).

3.5 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados animais Balb/C machos, pesando entre 20±5 g, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – PCARP-USP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (49Cx34Lx16A cm, com área total de 1666 cm², representando 277,67 cm² para cada animal), em salas com controle de temperatura (20-24 °C), umidade natural (40-60%) e ciclos controlados (12 h claro/escuro), com oferta de ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo que os protocolos foram aprovados pelo Conselho de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, do Campus de Ribeirão Preto, Protocolo n. 16.1.788.60.8 (**Anexo 1**). Durante os experimentos, os animais foram mantidos em jejum de no máximo 8 h.

3.6 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (Maxisafe 2020, Câmara de Segurança Biológica Classe II, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) e mantidas em incubadora de CO₂ a

37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Form® 310 series, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

As linhagens de células CHO-k1 (CHO-K1 ATCC® CCL-61® *Cricetulus griseus*, epitélio ovariano) e L929 (ATCC® CCL-1®, *Mus musculus*, tecido conjuntivo subcutâneo; areolar e adiposo - fibroblasto, NCTC clone 929 [*L cell, L-929, derivative of Strain L*]) foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA). A linhagem de células THP-1 (ATCC® TIB-202® *Homo sapiens*, monócitos de sangue periférico de leucemia monocítica aguda) foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) e a linhagem de células RAW 264.7-Luc (ATCC® TIB-71®, *Mus musculus*, macrófago proveniente de tumor de Abelson induzido por vírus, geneticamente modificado chamada de RAW-Luc), que expressa o gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB (pNF-κB-Luc) foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) (COOPER et al., 2010; WANG et al., 2014). As linhagens utilizadas foram cultivadas em frascos de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL ou de 75 cm² com volume de 250 mL. Os meios foram suplementados com 10% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B – PSA), e 1% de L-glutamina. A manutenção foi realizada antes que as células atingissem a confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio de inversão (Leica DM IL Inverted Microscope, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA).

3.7 Ensaios de citotoxicidade in vitro

3.7.1 Delineamento experimental

Os experimentos de cultura celular foram realizados, em parte, no Laboratório de Fotoquimioproteção da Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no Laboratório de Farmacologia do Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e no exterior em parceria com a Dra. Marivane Lemos e com a Profa. Dra. Helen Sheridan na *School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Sciences, Trinity College*, Dublin, Irlanda. Avaliaram-se os efeitos toxicológicos da OCP e do AH *in vitro*, sendo investigadas atividades citotóxicas em células não-tumorais (CHO-k1 e

L929), bem como na linhagem neoplásica THP-1, visando complementar os resultados obtidos na investigação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

3.7.2 Citotoxicidade por fosfatase ácida

A atividade citotóxica foi determinada pelo ensaio de fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991). As placas foram lavadas com 100 µL de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 °C, 5% de CO₂ com solução de 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato, na concentração de 0,0027 g/mL em 0,1 M de acetato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e pH 5,5. Após essa incubação, adicionaram-se 50 µL de NaOH a 1 M para interromper a reação. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm.

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a equação a seguir:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{(Média\ ABS_{tratado} - Média\ ABS_{branco})}{Média\ ABS_{controle\ negativo}}$$

3.7.3 Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 5 x 10⁴ células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após vinte 24 h, as células foram tratadas com concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/poço para a OCP e de 0,1, 1,0, 3,0, 10,0, e 30 µM/poço de AH, sendo utilizados como controles positivos as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 nM/poço, celecoxib e indometacina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 h. Após o tempo de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993).

3.7.4 Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada THP-1

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 15×10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. As células foram diferenciadas adicionando-se uma solução de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, 2 µg/mL) na concentração de 10 µL/mL de meio (2 µL/poço). Após 48 h, as células foram tratadas com concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/poço para a OCP e de 0,1, 1,0, 3,0, 10,0, e 30 µM/poço de AH, sendo utilizados como controles positivos as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 nM/poço, celecoxib e indometacina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 h. Após o tempo de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993).

3.8 Avaliação da atividade locomotora

3.8.1 Campo aberto – Open field

Para verificação dos efeitos da OCP e do AH sobre a atividade motora dos animais, foi utilizado o modelo de *Open Field*, de acordo com o modelo de Hall e Ballachey (1932), com algumas modificações. Este teste verifica se as amostras interferem na função motora dos animais, ou seja, se há efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) do animal, causando a ausência de resposta aos estímulos e resultando em um falso-positivo para a atividade antinociceptiva. Os animais (n=6) foram pré-tratados via intraperitoneal (i.p.) com diazepam 1 mg/kg (controle positivo), via oral (v.o.) com o veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), OCP (10 mg/kg) e AH (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos (com exceção do diazepam, administrado 30 min antes ao experimento), os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O campo aberto consiste em uma caixa, com 60 cm de diâmetro e borda de 50 cm de altura, com a parte inferior dividida em nove quadrantes de área igual (**Figura 5**). O número de cruzamentos realizados com as quatro patas entre as divisões (*crossings*) e da atividade exploratória vertical (*rearings*) foi quantificado durante uma sessão de 5 min (HALL; BALLACHEY, 1932).



Figura 5. Teste do campo aberto (*Open-field*)

3.8.2 Rota Rod

Para verificação dos efeitos da oleorresina de *Copaifera pubiflora* e do ácido *ent-hardwíckiico* sobre a coordenação motora dos animais foi utilizado o modelo de *Rota Rod* de acordo com Jones e Roberts (1968), com algumas modificações. Este teste verifica, de maneira complementar ao campo aberto, se as amostras interferem na função motora dos animais, ou seja, se há efeitos sobre o SNC do animal, causando a ausência de resposta aos estímulos, podendo resultar em um falso-positivo para a atividade antinociceptiva. Vinte e quatro horas anteriores ao experimento, os animais foram treinados e somente os que ficavam sobre a barra giratória por um período superior a 1 min durante dois períodos consecutivos foram selecionados para o experimento. No dia do experimento, os animais (n=6) foram pré-tratados via i.p. com diazepam 1 mg/kg (controle positivo), veículo (v.o.; controle negativo, solução de Cremofor 10%), OCP (v.o.; 10 mg/kg) e AH (v.o.; 10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos (com exceção do diazepam, administrado 30 min antes ao experimento), os animais foram submetidos ao teste do *Rota Rod*. O aparelho *Rota Rod* é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 rpm. Os animais foram colocados na barra por 1 min, sendo registrado o tempo de permanência (em segundos) (**Figura 6**).



Figura 6. Equipamento Rota Rod

3.9 Edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo experimental de inflamação aguda bem conhecido, sendo amplamente utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória de diferentes compostos. Para realização deste teste, os animais foram pré-tratados 60 min antes do experimento com OCP (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg), AH (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg) e cremofor 10% (v.o.; veículo). A indometacina (v.o.; 10 mg/kg) e a dexametasona (s.c.; 5 mg/kg) foram usados como controles positivos. Uma hora após os tratamentos, o edema foi induzido pela injeção i.p. de 20 μ L de carragenina (300 μ g/pata). Na pata contralateral foram administradas 20 μ L de salina para controle. A medida do edema foi mensurada pela diferença entre os volumes deslocados da pata direita e os da pata esquerda em μ L/pata. Para a mensuração foi utilizado um pletismômetro 7140 (Ugo Basile) (**Figura 7**) nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h após a injeção de carragenina (SADEGHI et al., 2011).



Figura 7. Teste do edema de pata induzido por carragenina.

3.10 Avaliação da hiperalgesia mecânica através do monofilamento de Von Frey

Para realização da avaliação da hipernocicepção mecânica foram utilizados os animais previamente submetidos ao edema de pata induzido por carragenina. Portanto, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente (9x7x11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais.

A frequência de resposta de retirada foi obtida por meio de 10 aplicações (duração de 1 segundo cada) do filamento de Von Frey 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Os estímulos foram realizados na superfície plantar da pata traseira direita e, também, da pata traseira esquerda do animal, quando necessário, com o objetivo de determinar o limiar mecânico basal. Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia e novamente reavaliados em diferentes tempos após a injeção de carragenina. Deste modo, os animais acondicionados em plataforma de Von Frey foram avaliados quanto à hipernocicepção com monofilamento de Von Frey nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h após a injeção de carragenina (**Figura 8**).



Figura 8. Teste de estimulação mecânica na pata de camundongos com o monofilamento de Von Frey 0,6g

3.11 Determinação de interferon-gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em sistema multi-spot utilizando a linhagem celular imortalizada THP-1

Alíquotas de 600 μ L/poço da suspensão celular contendo 28×10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. As células foram diferenciadas adicionando-se uma solução de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, 2000 ng/mL) na concentração de 10 μ L/mL de meio (6 μ L/poço). Após 48 h, as células foram tratadas com a OCP nas concentrações de 30 e 100 μ g/poço e AH nas concentrações de 3,0 e 10,0 μ M/poço, os controles positivos com as substâncias celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 μ M/poço, e infliximab nas concentrações de 10 e 50 nM/poço. Uma hora após os tratamentos, as placas foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10 μ g/mL (SCHILDBERGER et al., 2013; SONG; PHELPS, 2000). As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 h e 72 h. O sobrenadante (alíquotas de 60 μ L) foi coletado para dosagem de interferon-gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e analisado em sistema MSD® Multi-spot Assay System (Meso Scale Discovery, Rockville, USA), processados de acordo com as instruções do fabricante, e interpolados pela quantidade de proteínas totais em cada amostra.

3.12 Artrite induzida por zymozan

A indução da artrite por zymozan foi realizada conforme descrito por Schneider et al. (2019), com algumas alterações. Deste modo, 10 µL de suspensão de zymozan (30 µg/µL) em solução salina estéril (NaCl a 0,9%; veículo) foram injetados na articulação femoral-tibial (intra-articular) de ambos os joelhos de camundongos sob anestesia leve com isoflurano (1,5%) 1 h antes dos tratamentos com o veículo, OCP (10 mg/kg) e AH (10 mg/kg).

3.12.1 Determinação da hiperalgesia articular

A articulação femorotibial foi utilizada para a determinação da hiperalgesia articular conforme descrito por Pinto et al. (2010). Para adaptação ambiental, trinta minutos antes do teste, os animais foram colocados em uma sala silenciosa, em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) com um piso de arame. As estimulações foram realizadas com os animais quietos, não apresentando movimentos exploratórios ou defecação e não apoiados nas patas. Foi utilizado um medidor de pressão que consiste em um transdutor de força portátil equipado com uma ponta de propileno (4.15 mm²) (IITC Inc., Life Science Instruments, Columbia, MD, USA). Uma força perpendicular crescente foi aplicada à área central da superfície plantar da pata traseira para induzir a flexão da articulação femorotibial, seguida pela retirada da pata (PINTO et al., 2010). A pressão da força aplicada pela pata foi registrada pelo medidor de pressão. O teste foi repetido até que três medições consecutivas consistentes (variação <1 g) fossem obtidas. O limiar mecânico é expresso em gramas (g) e a hiperalgesia é equiparada a uma redução desse limiar.

3.12.2 Edema articular

Após seis horas (h), as espessuras das articulações do joelho foram medidas em milímetros (mm) por meio de um paquímetro (Marberg, Brasil). Os resultados foram expressos como a média ± EPM da diferença entre o diâmetro antes (basal) e após a administração do zymozan (Δmm).

3.12.3 Migração de neutrófilos

Após a medição da formação do edema, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia com isoflurano e, em seguida, a articulação do joelho foi aberta e lavada com solução salina contendo EDTA (1 mM). Alíquotas das lavagens resultantes foram diluídas em solução Turk. Os leucócitos foram contados com o auxílio da câmara de Neubauer e microscópio de luz. A hematoxilina-eosina foi utilizada para corar as células, possibilitando a realização da contagem diferencial em microscópio de luz.

3.13 Atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc (Ensaio da luciferase)

Visando investigar o possível efeito da oleorresina de *C. pubiflora* e do ácido *ent-hardwíckiico* sobre a atividade específica do NF-κB foram utilizados macrófagos RAW 264.7-Luc (ATCC® TIB-71®), chamada comumente de RAW-Luc, que expressa o gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB (pNF-κB-Luc) (COOPER et al., 2010; WANG et al., 2014). Alíquotas de 500 µL/poço da suspensão celular contendo 4×10^5 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com oleorresina de *C. pubiflora* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço e com o ácido *ent-hardwíckiico* nas concentrações de 10,0, e 30,0 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após 30 min, as células foram incubadas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1 µg/mL (500 ng/poço) durante 6 h, à 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi removido, lavado com PBS gelado e as células foram lisadas com auxílio de êmbolo de seringa de insulina, utilizando 50 µL de tampão de lise celular TNT (Tris-HCl 10 mM a pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM e Triton a 1%, sendo centrifugadas durante 5 min a 4 °C. Em seguida, 10 µL desta solução for alíquotados em placa de 96 poços e adicionados 25 µL de tampão contendo a solução de substrato para luciferase (kit de sistema de ensaio de luciferase, *Dual Luciferase Reporter assay system*, Promega, Fitchburg, WI, USA). Em seguida, foi levado ao luminômetro para o registro da intensidade luminosa (Victor X5, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A atividade da luciferase foi expressa através do aumento do *fold* de luciferase comparado com o controle, correspondente à

ativação do NF- κ B. No sobrenadante, foi determinada a concentração de TNF- α através de ensaio de ELISA.

3.14 Avaliação da nocicepção espontânea produzida por formalina

Considerado um modelo de dor associado à lesão tecidual provocada pela injeção de formalina (2,5% de formaldeído em solução salina) na pata do camundongo, esse teste segue um padrão bifásico constituído por uma fase inicial aguda (dor neurogênica) e um período mais prolongado (dor inflamatória) de atividade comportamental aumentada, sendo amplamente utilizado para screening das atividades analgésica e anti-inflamatória (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Para sua realização, os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6), e pré-tratados utilizando a via subcutânea (s.c.) com morfina 5 mg/kg (controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); OCP (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e AH (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg). Após 30 min, os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl) de formalina 2,5% (20 μ L/pata). Imediatamente após a administração da formalina, o tempo em que o animal lambe a pata injetada foi cronometrado em duas fases (0-5'; 1ª fase; dor neurogênica); (15-30'; 2ª fase; dor inflamatória), sendo considerado tempo zero o momento imediatamente após a administração da formalina.

3.15 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste consiste no fato de que uma injeção intraperitoneal do ácido acético a 0,6% provoca uma reação nociceptiva, caracterizado pela contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão das patas posteriores (COLLIER et al., 1968; KOSTER; ANDERSON; DEBEER, 1959). Para a realização do mesmo, os animais foram pré-tratados com indometacina 10 mg/kg (v.o; controle positivo), cremofor 10% (v.o.; controle negativo), OCP (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg) e AH (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg). Após 30 min, os animais receberam a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (0,1 mL/10 g do animal). As respostas contorsivas (contorções no abdômen e extensão das patas traseiras) foram quantificadas durante 20 min e consideradas como resposta nociceptiva.

3.16 Teste de retirada de cauda (Tail-flick)

Para avaliar o tempo de reação ao calor foi utilizada uma fonte radiante de calor que emite somente um ponto a 55 °C (D'ARMOUR, F. SMITH, 1992; MANSOURI; NAGHIZADEH; GHORBANZADEH, 2014). Primeiramente, os animais foram avaliados para determinar o limiar térmico basal e o tempo de latência à reação do calor (**Figura 9**).

Esses dados serviram de parâmetro de tempo(s) que cada animal levou para retirar a cauda (tempo de latência), o qual foi cronometrado. Os animais foram selecionados 24 h antes do experimento e aqueles que apresentaram resposta curta e rápida ao estímulo doloroso foram selecionados para o teste. Para a realização do mesmo, os animais foram pré-tratados via i.p com morfina 5 mg/kg (controle positivo), veículo (v.o.; controle negativo, solução de Cremofor 10%), OCP (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg) e AH (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg). Além disso, três diferentes grupos foram incluídos para investigar os possíveis efeitos antagônicos da OCP e do AH: o primeiro foi tratado via i.p. com naloxona (1 mg/kg), administrado em conjunto com AH (v.o.; 10 mg/kg), o segundo foi tratado com naloxona (i.p.; 1 mg/kg) administrado juntamente com a OCP (v.o.; 10 mg/kg) e o terceiro foi tratado com naloxona (i.p.; 1 mg/kg) em conjunto com a morfina (s.c.; 5 mg/kg).



Figura 9. Teste de retirada de cauda (*Tail-Flick*).

3.17 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA). Como pós-teste foi utilizado o Teste de Bonferroni Dunett ou Tukey. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®], versão 5.0 ou Origin[®], versão 9.1, admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$ ou menor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural do ácido *ent*-hardwíckiico

As análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiram identificar o metabólito da classe dos clerodanos, conhecido como ácido *ent*-hardwíckiico (ácido *ent*-15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico), (**Figura 10**).

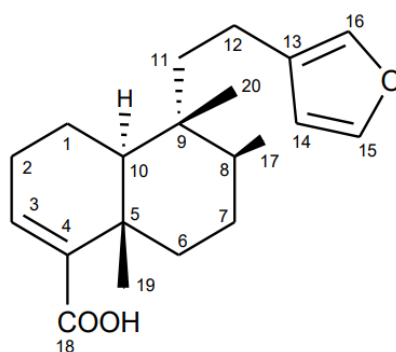


Figura 10. Estrutura química do metabólito ácido *ent*-hardwíckiico

O espectro de RMN ^1H desta substância (**Apêndice 1**) apresentou diversos sinais na região compreendida entre δ 0,6 e 2,6, característicos dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, presentes na maioria dos diterpenos. Os hidrogênios relativos ao anel furânico presentes na estrutura desse diterpeno (H-14, H-15 e H-16) foram atribuídos respectivamente aos sinais em δ 6,26 (1H, *m*), δ 7,35 (1H, *t*, $J_{14-15} = J_{15-16} = 1,6$ Hz) e δ 7,20 (1H, *s(l)*). É possível também observar um *dd* (1H, $J_{2a-3} = 4,0$; $J_{2b-3} = 2,8$), em δ 6,86, que foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-3. Finalmente, os hidrogênios metílicos H-17, H-19 e H-20 foram atribuídos aos sinais em δ 0,83 (3H, *d*, $J_{8-17} = 6,4$), δ 1,26 (3H, *s*) e δ 0,76 (3H, *s*), respectivamente.

Em relação ao espectro de RMN ^{13}C (**Apêndice 2**) destacam-se os sinais relativos aos carbonos pertencentes ao anel furânico (C-13, C-14, C-15 e C-16), os quais aparecem em δ 125,6, 111,0, 142,7 e 140,3, respectivamente. Destacam-se ainda os sinais em δ 138,4 e 141,5 atribuídos aos carbonos olefínicos C-3 e C-4 e o carbono carbonílico C-18 em δ 172,9.

Todos os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C obtidos foram comparados aos dados da literatura (MCCHESENEY; CLARK; SILVEIRA, 1991; PINTO et al., 2000) e encontram-se dispostos nas **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 1. Dados de RMN ^1H do AH (400 MHz, CDCl_3 , multiplicidade, J em Hz)

^1H	McChesney et al., 1991	AH
3	6,90 <i>t</i> ($J = 3,0$)	6,86 <i>dd</i> ($J_{2a-3} = 4,0$; $J_{2b-3} = 2,8$)
14	6,25 <i>m</i>	6,26 <i>m</i>
15	7,37 <i>m</i>	7,35 <i>t</i> ($J_{14-15} = 1,6$; $J_{15-16} = 1,6$)
16	7,23 <i>s</i> (<i>l</i>)	7,20 <i>s</i> (<i>l</i>)
17	0,85 <i>d</i> ($J = 6,0$)	0,83 <i>d</i> ($J_{8-17} = 6,4$)
19	1,27 <i>s</i>	1,26 <i>s</i>
20	0,80 <i>s</i>	0,76 <i>s</i>

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C do AH (100 MHz, CDCl_3)

^{13}C	McChesney et al ., 1991	AH
1	17,5	17,4
2	27,3	27,5
3	136,8	138,4
4	142,5	141,5
5	37,3	37,6
6	35,9	35,8
7	27,1	27,3
8	36,3	36,2
9	38,8	38,8
10	46,6	46,6
11	38,6	38,6
12	18,6	18,3
13	125,6	125,6
14	111,0	111,0
15	142,7	142,7
16	138,4	140,3
17	15,9	16,0
18	167,9	172,9
19	20,7	20,5
20	18,2	18,2

4.2 Avaliação do potencial citotóxico da oleorresina de *Copaifera pubiflora* e do ácido *ent-hardwíckiico*

Os resultados obtidos após a realização do teste de fosfatase ácida demonstraram que a citotoxicidade da OCP ($IC_{50} = 121,27 - 378,19 \mu\text{g/mL}$) e do AH ($IC_{50} = 45,01 - 653,56 \mu\text{M}$) nas três linhagens testadas foi significativamente menor do que a do paclitaxel ($IC_{50} = 0,082 - 0,112 \mu\text{M}$) e da camptotecina ($IC_{50} = 0,124 - 0,518 \mu\text{M}$) (**Tabela 3**).

O potencial citotóxico de diferentes oleorresinas de copaíba foi avaliado em diversos estudos. De modo geral, os melhores resultados de citotoxicidade vieram de constituintes sesquiterpênicos (FURTADO et al., 2018; PFEIFER BARBOSA et al., 2019). A avaliação da citotoxicidade dos diterpenoides geralmente resulta em efeitos citotóxicos fracos a moderados e não seletivos. Estudos realizados por Pfeifer Barbosa et al. (2019) mostraram que os diterpenos ácido *ent*-poliáltico (isômero do ácido *ent*-hardwíckiico), ácido *ent*-agático, ácido *ent*-caurenóico, ácido colavenico e o ácido (13E)-labda-7,13-dien-15-óico, isolados da oleorresina de *Copaifera reticulata*, não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares tumorais HEP-G2, HT-29, A-375, HCT-116, A-549, MDA-MB-231, e HaCaT. Cavalcanti et al. (2006) relataram que o ácido *ent*-caurenóico apresentou citotoxicidade relacionada a danos inespecíficos à membrana, interagindo com o DNA em fibroblastos de hamster (células V79). Posteriormente, o mesmo autor relatou que o composto possui potencial terapêutico reduzido devido à sua toxicidade não seletiva (CAVALCANTI et al., 2006). Carneiro et al. (2020) avaliaram 14 terpenoides não voláteis, incluindo o ácido *ent*-hardwíckiico. Tais diterpenos foram isolados de três oleorresinas de espécies de *copaifera* (*C. multijuga*, *C. pubiflora* e *C. trapezifolia*). Os resultados demonstraram que nenhum dos diterpenos testados apresentou alta citotoxicidade contra quatro linhagens de células tumorais (A559, ACP01, HeLa e MCF-7). A única exceção foi o ácido *ent*-labda-5,13-dien-15-óico, que exibiu efeito citotóxico relevante contra a maioria das linhagens testadas (CARNEIRO et al., 2020). Além disso, o ácido diterpênico AH não apresentou citotoxicidade contra seis diferentes linhagens celulares tumorais em estudo realizado por Vargas et al. (2015). Por outro lado, Carneiro et al. (2020) mostraram que a oleorresina de *Copaifera pubiflora* exibiu valores de IC_{50} promissores contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), mas não foi citotóxico contra a linhagem tumoral A549.

A presença de compostos sesquiterpênicos na oleorresina pode justificar essas atividades, por desempenhar um papel importante na citotoxicidade das oleorresinas de *Copaifera*. Em nosso estudo, nenhum potencial citotóxico foi encontrado para o OCP, mas é importante observar que diferentes linhagens celulares podem gerar diferentes resultados de citotoxicidade, conforme relatado anteriormente. Portanto, a avaliação citotóxica em diferentes linhagens celulares é necessária para expandir o banco de dados e investigar a possível seletividade a uma linhagem celular específica.

Tabela 3. Citotoxicidade da oleorresina de *Copaifera pubiflora* e do ácido *ent-hardwíckiico* nas linhagens celulares L929, CHO-k1 e THP-1.

Linhagens celulares	OCP ($\mu\text{g/mL}$)	AH (μM)	Paclitaxel (μM)	Camptotecina (μM)	Celecoxibe (μM)	Indometacina (μM)
L929	154,34 \pm 6,17	653,56 \pm 58,64	0,082 \pm 0,019	0,124 \pm 0,036	0,311 \pm 0,041	0,082 \pm 0,013
CHO-k1	378,19 \pm 45,87	167,33 \pm 28,17	0,135 \pm 0,092	0,192 \pm 0,0121	0,614 \pm 0,024	0,536 \pm 0,051
THP-1	121,27 \pm 9,92	45,01 \pm 9,80	0,112 \pm 0,013	0,518 \pm 0,0351	0,043 \pm 0,014	0,037 \pm 0,015

4.3 Avaliação da atividade locomotora

Dois modelos animais foram escolhidos para verificar se a OCP e o AH promovem depressão do sistema nervoso central, resultando em efeitos na coordenação neuromuscular. Essa avaliação evita resultados falso-positivos nas avaliações anti-inflamatória e antinociceptiva. Outrossim, os testes do campo aberto (*open-field*) e Rota Rod fornecem uma primeira estimativa rápida e direta da ocorrência de depressão no sistema nervoso central.

O tratamento subcutâneo com diazepam (1 mg/kg) afetou a atividade locomotora dos animais após 30 min. Em contraste, a OCP e o AH (10 mg/kg) não afetaram a capacidade locomotora dos animais, como apresentado na **Figura 11 (A e B)**. No teste do Rota Rod, os animais tratados com OCP e AH não apresentaram alterações significativas na coordenação motora (**Figura 11, C**).

Portanto, a partir dos resultados obtidos no teste ao campo aberto e Rota Rod, foi possível sugerir que a OCP e o AH não possuem efeitos depressores ou

estimulantes do sistema nervoso central, caracterizados por uma diminuição ou aumento da locomoção espontânea.

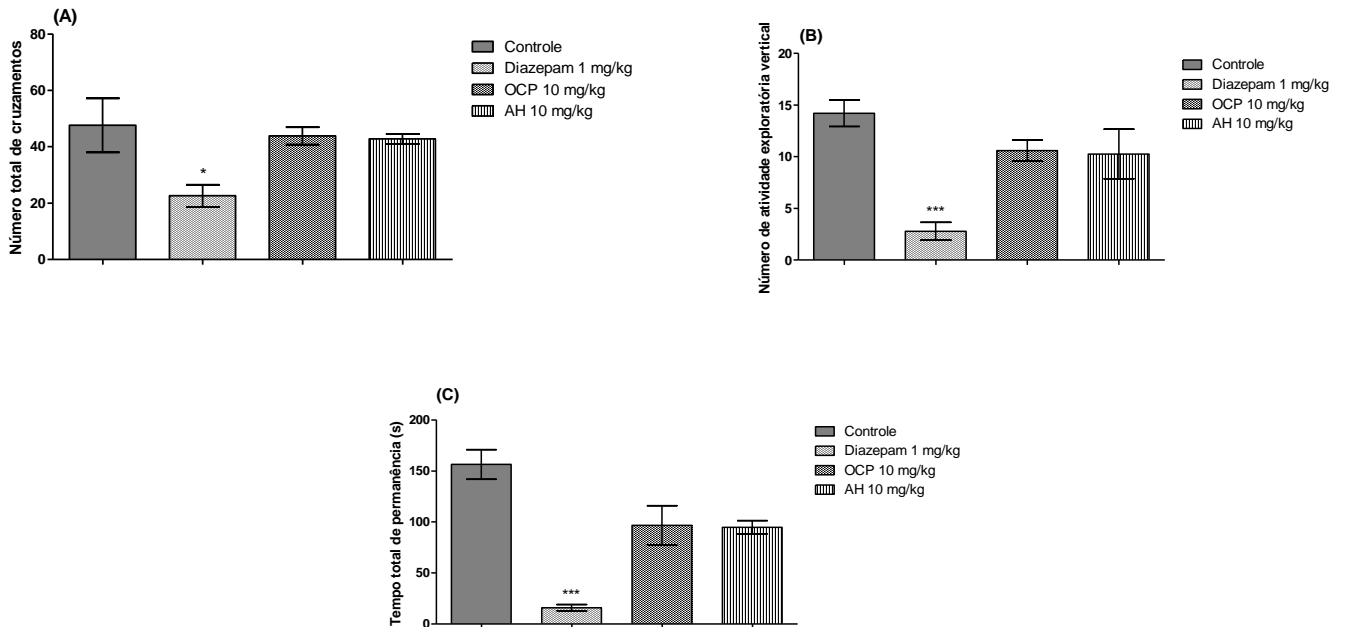


Figura 11. Efeitos da administração de diazepam (1 mg / kg), oleorresina de *Copaifera pubiflora* (10 mg/kg) e ácido *ent-hardwíckiico* (10 mg/kg) sobre a atividade locomotora dos animais nos testes campo aberto **(A e B)** e Rota Rod **(C)**. Os dados representam a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste a posteriori de Dunnett (* $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

4.4 Edema de pata induzido por carragenina

Inicialmente, investigamos os efeitos do AH e da OCP sobre a inflamação e hiperalgesia inflamatória utilizando o modelo clássico de inflamação induzida por administração intraplantar de carragenina.

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado proveniente de algas marinhas. A inflamação induzida pela carragenina pode ser usada para avaliar a produção de mediadores inflamatórios em locais de inflamação, as propriedades anti-inflamatórias de agentes como anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e a eficácia de compostos

analgésicos para reverter a hipersensibilidade (LI et al., 2011). Ademais, a indução da inflamação pela injeção de carragenina é geralmente caracterizada por um acúmulo de exsudato e intensa migração de células inflamatórias com o consequente desenvolvimento de hiperalgesia e edema (POSADAS et al., 2004).

Neste modelo experimental, o tratamento oral dos animais com a OCP nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg causou inibições máximas de $67 \pm 6\%$, $74 \pm 4\%$ ($p < 0,05$) e $76 \pm 6\%$ ($p < 0,01$). A dose de AH de 1 mg/kg foi a menos eficaz, causando inibição de $46 \pm 4\%$. As doses de 3 e 10 mg/kg causaram inibições máximas de $52 \pm 6\%$ e $58 \pm 8\%$ respectivamente ($p < 0,05$). A indometacina (10 mg / kg) e a dexametasona (5 mg/kg), usadas como controles positivos, também inibiram significativamente a resposta edematogênica com inibição de $77 \pm 3\%$ e $86 \pm 8\%$, respectivamente ($p < 0,01$) **(Figura 12, A e B)**.

Estes resultados sugerem que os efeitos da OCP e do AH ocorram sobre a redução de mediadores pró-inflamatórios, que favorecem a gênese e a manutenção do edema. Nesse sentido, faz-se imperativo ressaltar que as ações de tais mediadores são dependentes da presença de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Estudos demonstraram por meio de análise histológica que a injeção intraplantar de carragenina promove a infiltração de neutrófilos no tecido subcutâneo da pata do animal (SOKOLOVA et al., 2016; VINEGAR; TRUAX; SELPH, 1973).

As oleorresinas de *C. reticulata* e *C. multijuga* também inibiram o edema quando avaliadas nesse mesmo teste (CASTRO GHIZONI et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017). Além disso, é importante destacar que estudos realizados por VEIGA et al. (2007) demonstraram que as oleorresinas de *Copaifera cearensis* e *Copaifera multijuga* inibiram a produção de NO, que possui um importante papel regulatório no estágio agudo da inflamação, promovendo uma potente ação vasodilatadora auxiliando no aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, na chegada das células ao local da lesão (VEIGA et al., 2007; ZHAN et al., 2016). A oleorresina de *Copaifera reticulata* também foi capaz de promover redução nos níveis de NO (SENEDESE et al., 2013).

Os resultados obtidos nos estudos citados, associados aos resultados obtidos para OCP e para o AH no teste de edema de pata induzido por carragenina, contribuem para a sugestão de que a oleorresina de *C. pubiflora* pode agir reduzindo a ação dos mediadores envolvidos no processo inflamatório, uma vez que estudos realizados relatam também que a resposta celular induzida pela carragenina envolve

a participação de importantes mediadores pró-inflamatórios como prostaglandina E₂ (PGE₂), TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, bem como o aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e p-selectina. Outrossim, a inibição desses mediadores podem estar resultando na redução da migração dos neutrófilos e consequente formação do edema (DALMARCO; MEDEIROS; FRÖDE, 2008; SOKOLOVA et al., 2016; VAZQUEZ et al., 2015).

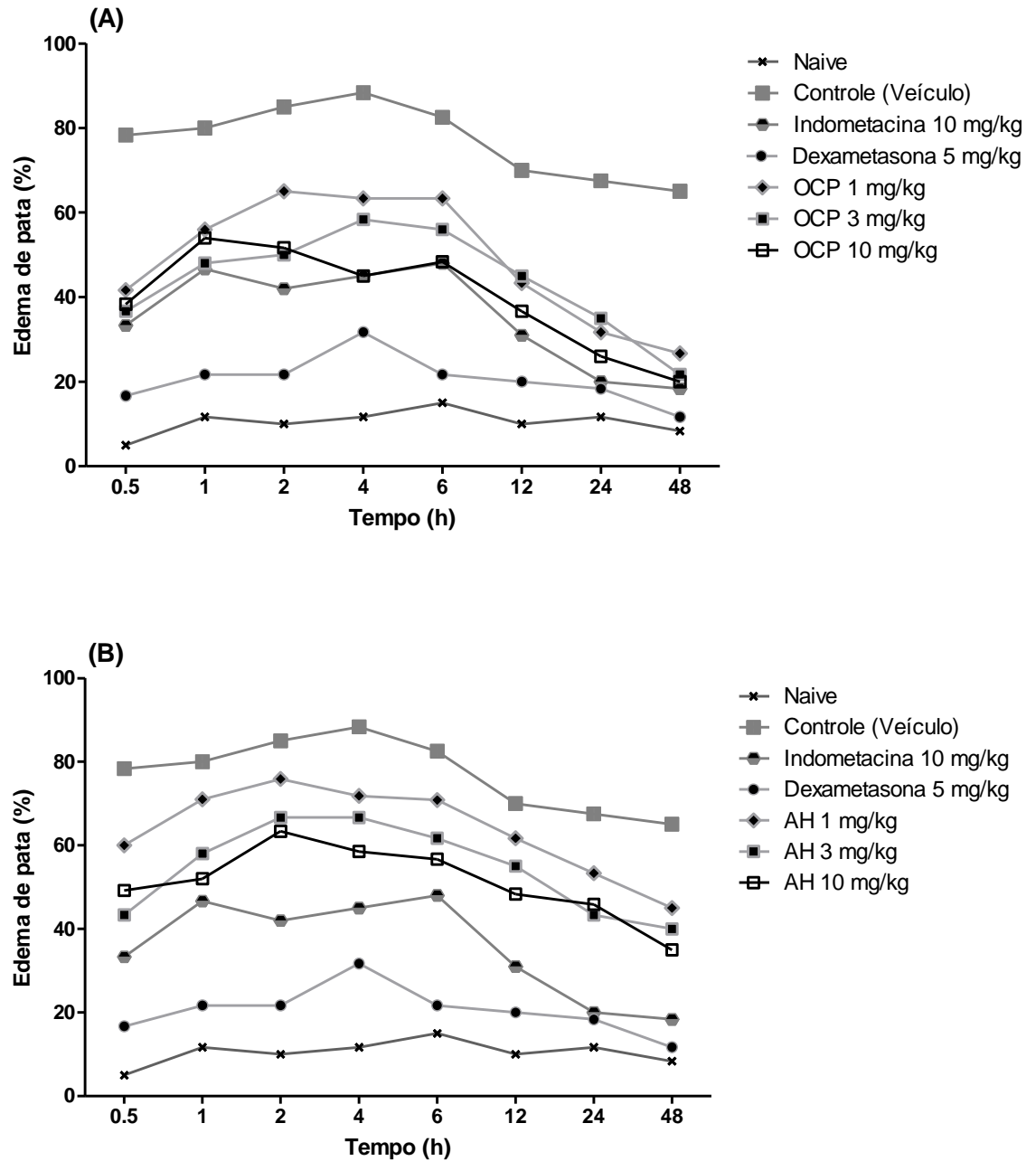


Figura 12. Efeitos anti-inflamatórios da OCP administrada por via oral (1, 3 e 10 mg/kg) **(A)**, e do AH (1, 3 e 10 mg/kg) **(B)** no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6) quando comparado com o controle.

4.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica através do monofilamento de Von Frey

Os experimentos baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além do estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção.

Particularmente, o teste de von Frey é usado para avaliar, por meio do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica), a sensibilidade tecidual (CHAPON et al., 2019; COUTAUX et al., 2005; VERGNOLLE et al., 2001; VON FREY, 1896).

Desse modo, para avaliar a hipernocicepção mecânica, os animais previamente submetidos ao teste de edema de pata induzido por carragenina foram avaliados quanto a hiperalgesia.

O pré-tratamento com a OCP e com o AH (1, 3 e 10 mg/kg) diminuiu a intensidade da hipernocicepção inflamatória mecânica na hiperalgesia induzida por carragenina. Nas doses de 1 e 3 mg/kg, a OCP causou inibições máximas de $59 \pm 9\%$ e $65 \pm 6\%$ ($p < 0,05$). A dose de 10 mg/kg foi a mais eficaz, registrando inibição de $76 \pm 3\%$ ($p < 0,01$). O AH (1, 3 e 10 mg/kg) também registrou altas inibições ($67 \pm 12\%$, $69 \pm 6\%$ e $74 \pm 2\%$ respectivamente, $p < 0,05$) em comparação com os controles indometacina e dexametasona $77 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) e $80 \pm 2\%$ ($p < 0,01$), respectivamente (**Figura 13, A e B**). A área sob a curva (AUC) calculada até 4 h após a injeção de carragenina mostrou que o AH (3 mg/kg e 10 mg/kg) e a OCP (3 mg/kg e 10 mg/kg) inibiram significativamente a hipernocicepção no animais testados ($p < 0,05$) (**Figura 13, C**).

Como descrito anteriormente, na hiperalgesia inflamatória, ocorre a sensibilização de neurônios nociceptores aferentes primários por mediadores inflamatórios, culminando na diminuição do limiar noiceptivo e ocorrência de episódios de dor.

Estudos anteriores demonstraram que a oleorresina de *Copaifera pubiflora* inibiu significativamente a hiperalgesia induzida por carragenina (SÍMARO et al., 2020). Além disso, a oleorresina de *Copaifera officinalis* também apresentou efeito anti-alodínico (DALENOGARE et al., 2019).

Portanto, os resultados observados corroboram com os efeitos vistos anteriormente no teste de edema de pata induzido por carragenina, uma vez que a

maioria dos mediadores envolvidos na formação do edema induzido por carragenina em camundongos, como bradicinina, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), prostaglandinas e IL-1 β , também contribuem para a estimulação e sensibilização de nociceptores aumentando a excitabilidade de neurônios aferentes primários (KHALIL et al., 2018; ROECKEL et al., 2016).

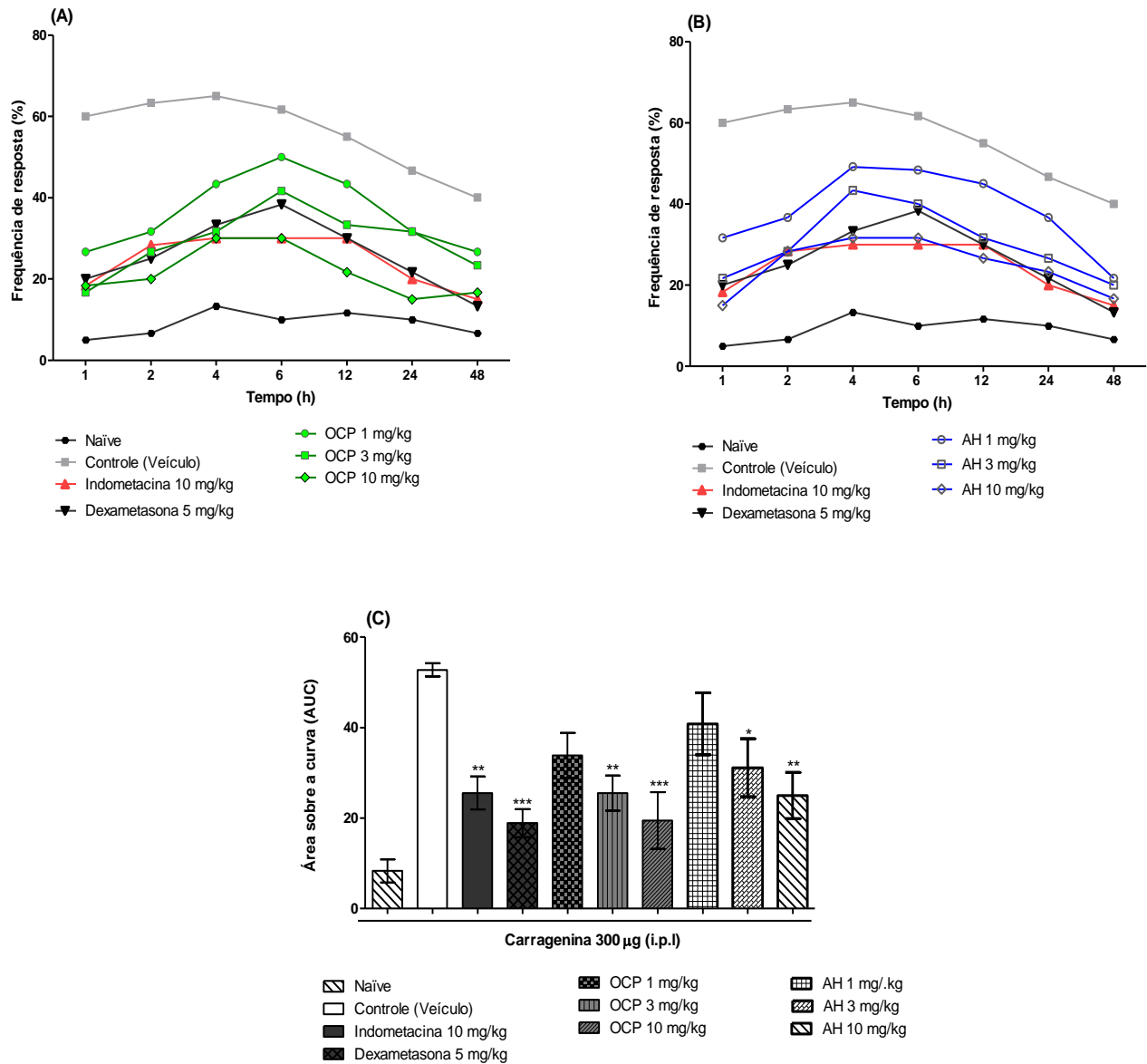


Figura 13. Efeitos da administração oral de indometacina (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg), OCP (1, 3 e 10 mg / kg) **(A)** e AH (1, 3 e 10 mg / kg) **(B)** na hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina (300 µg, 20 µL/pata) em camundongos. **(C)** Área sob a curva calculada 4 h após a indução com carragenina. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

4.6 Efeitos da OCP e do AH sobre a concentração de interferon-gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e em sistema multi-spot em células THP-1

Multi-spot ou *multi-array* é uma tecnologia que utiliza a técnica de eletroquimioluminescência acoplada a microchips, que permite a execução de diversas análises biológicas em um curto intervalo de tempo. Existem chips que são inseridos nos poços das placas, permitindo análises multipontuais de vários analitos, tais como biomarcadores e citocinas, em uma única amostra, e com uma única plataforma de dados. Este sistema utiliza volumes de amostra extremamente baixos (10 a 20 μ L), com grande sensibilidade, precisão e exatidão (pg/mL).

Outrossim, esta técnica foi utilizada para mensurar os níveis de INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , usando a linhagem celular imortalizada THP-1 para aferir se a OCP e o AH estão interferindo na produção de mediadores pró-inflamatórios.

A IL-1 β é conhecida por ser uma importante citocina pro-inflamatória, tendo papel crucial na gênese do processo inflamatório. Essa citocina tem como função regular a resposta de fase aguda mediante a um dano tecidual, seja por agentes infecciosos ou não infecciosos.

Foi possível observar que os níveis de IL-1 β foram diminuídos com o tratamento da OCP e do AH ($p < 0,001$) (**Figura 14**). Esse resultado é importante, uma vez que a IL-1 β participa de processos chaves na regulação do processo inflamatório como recrutamento de células inflamatórias, expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, liberação de quimiocinas e produção de prostanóides (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). A diminuição da IL-1 β também é interessante em doenças autoinflamatórias hereditárias como hiperalgesia, diabetes tipo 2 e mieloma, uma vez que participa ativamente da patogênese de tais doenças (DINARELLO, 2018; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010).

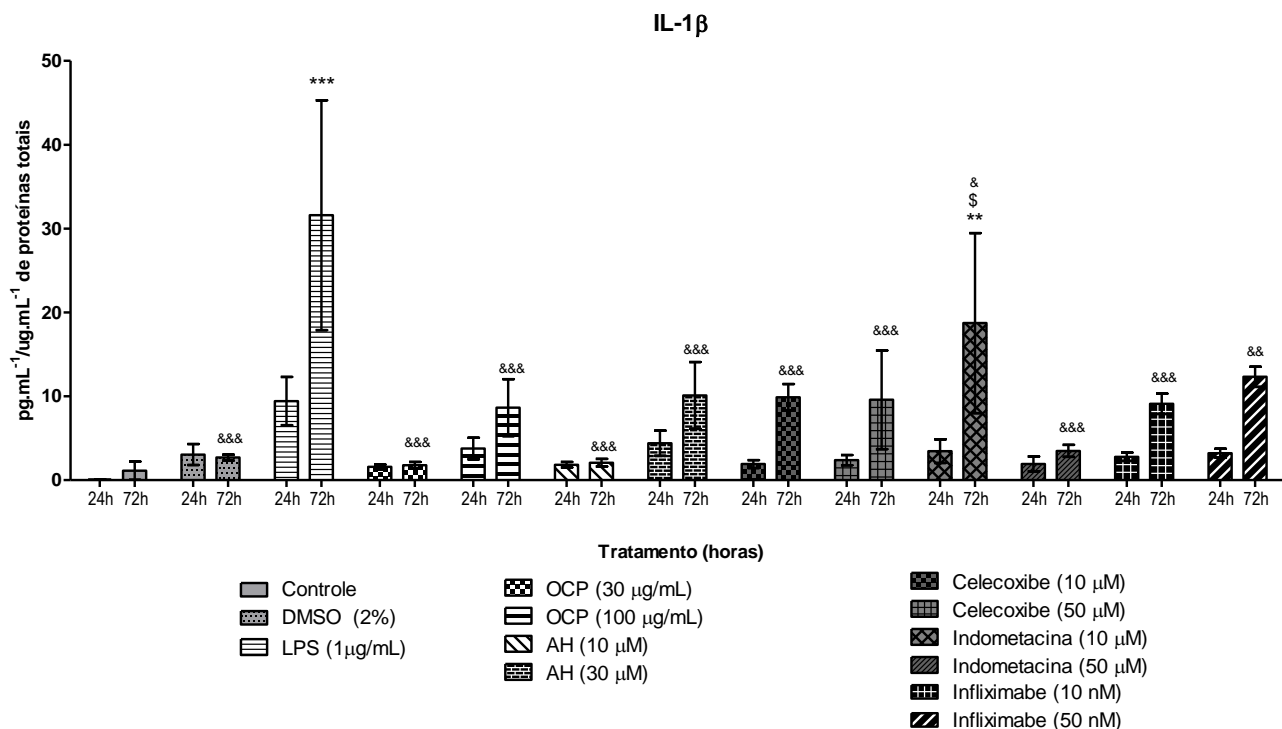


Figura 14. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, ácido *ent*-hardwíckiico, nas concentrações de 10 e 30 μM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 μM , e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1 β (pg/mL por $\mu\text{g/mL}$ de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($\$p < 0,05$) e grupo LPS (& $p < 0,05$, && $p < 0,01$ e &&& $p < 0,001$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

O INF- γ , por sua vez, aumenta a sinalização pró-inflamatória ao ativar macrófagos, que induzem a produção de óxido nítrico (NO), além de participar do processo de regulação da diferenciação das células dendríticas afim de intensificar o processo inflamatório (KOPITAR-JERALA, 2017).

Os resultados apresentados demonstraram que a OCP e o AH promoveram redução na produção desta citocina nos períodos avaliados (24 e 72 h) ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente) (**Figura 15**). Tal inibição se mostra significativa quando é

realizada a comparação de seus dados com aqueles obtidos pelos controles celecoxibe, indometacina e infliximabe.

A espécie *Copaifera officinalis* também apresentou efeito imunomodulador sobre os mediadores inflamatórios H₂O₂, NO, IFN- γ , TNF- α e IL-17. Além disso, estudos recentes mostraram que o AH pode inibir a síntese de NO, podendo ter relação com a inibição do IFN- γ e da IL-1- β , já que ambos são importantes reguladores da produção de NO (DE S. VARGAS et al., 2015; GELMINI et al., 2013; KOPITAR-JERALA, 2017; MÜLLER et al., 2017).

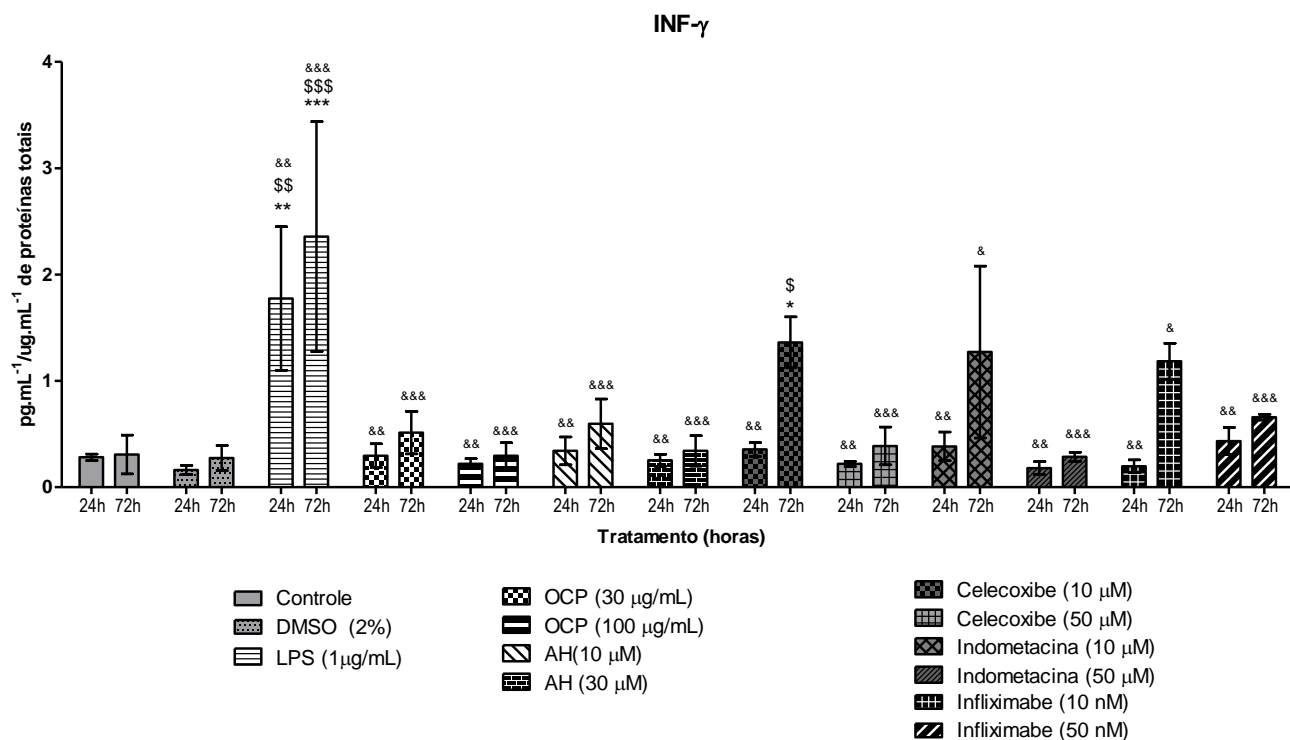


Figura 15. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 μg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 μM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 μM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF- γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 μg/mL) determinadas pelo método de multi-spot. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$ $p < 0,05$ e \$\$\$ $p < 0,01$) e grupo LPS (& $p < 0,05$, && $p < 0,01$ e &&& $p < 0,001$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

Juntamente com a IL-1 β e o TNF α , a IL-6 auxilia na produção das quimiocinas, as quais auxiliam na migração dos neutrófilos na fase inicial da inflamação. A IL-6 posteriormente irá promover uma mudança de recrutamento. Se primeiramente as células atraídas eram neutrófilos, em um segundo momento, mediante o processamento proteolítico do IL6R ocorre a redução da atração dos neutrófilos e aumento da atração de monócitos. Esse recrutamento é auxiliado por um estímulo na produção de quimiocinas atraentes de monócitos (CCL8, CCL2, CXCL5 e CXCL6) (KAPLANSKI et al., 2003; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Além disso,

moléculas de adesão celular como ICAM-1, VCAM-1 e CD62E (E-selectina) nas células endoteliais, bem como L-selectina (CD62L) nos linfócitos são reguladas positivamente pela trans-sinalização de IL-6, aumentando assim a transmigração de leucócitos (CHAPMAN; TUCKETT; SONG, 2008; KAPLANSKI et al., 2003).

No presente estudo, a OCP e o AH inibiram de maneira significativa ($p < 0,001$) os níveis de IL-6. Ademais, Vargas et al. (2015) demonstraram que o AH e o ácido copálico, ambos presentes na OCP, foram capazes de inibir a produção de NO e IL-6 (**Figura 16**).

Portanto, o estudo de possíveis bloqueadores da produção da IL-6 é de grande interesse, uma vez que a redução dessa interleucina resulta na atenuação dos efeitos pro-inflamatórios importantes para a manutenção do processo inflamatório.

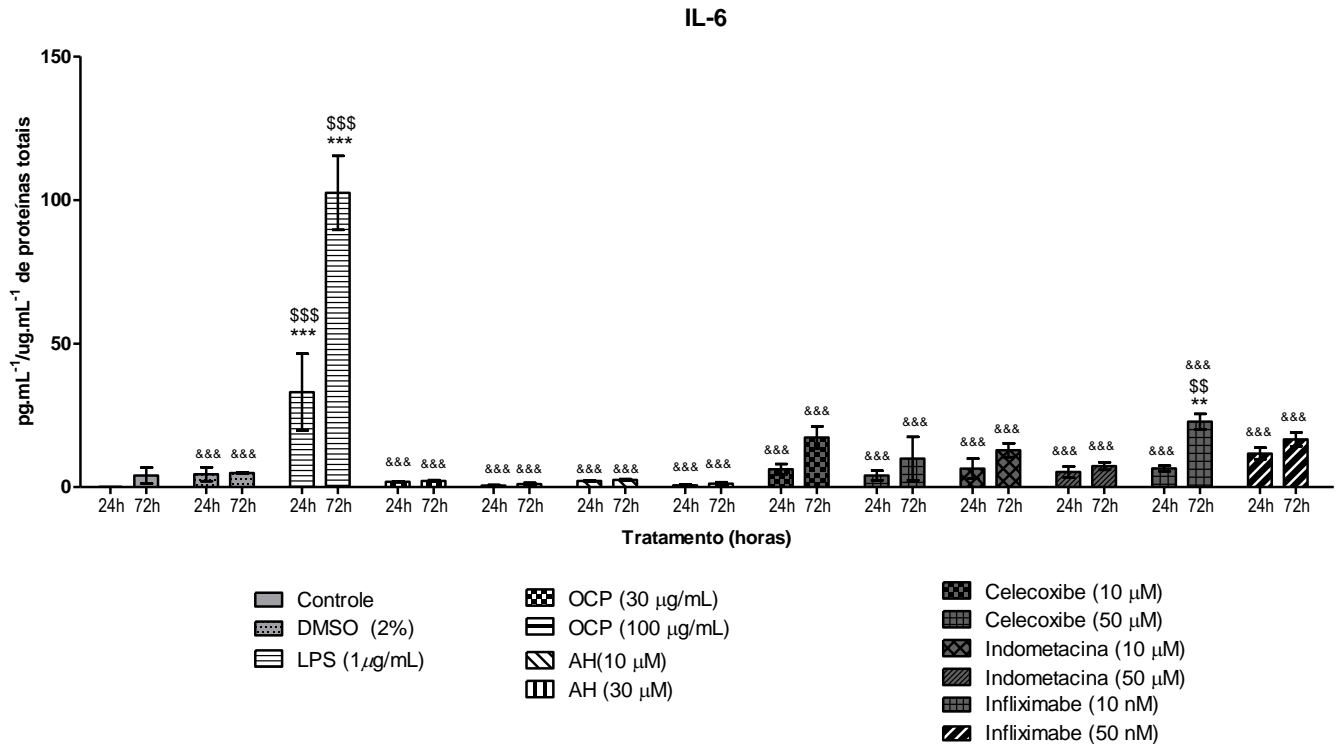


Figura 16. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 μg/mL, ácido *ent-hardwíckiico*, nas concentrações de 10 e 30 μM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 μM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 μg/mL) determinadas pelo método de multi-spot. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$\$p<0,01 e \$\$\$p<0,001) e grupo LPS (&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

Os receptores do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) podem ser expressos em várias células e tecidos. Dentre seus efeitos pró-inflamatórios destacam-se aqueles exercidos no endotélio vascular, que facilitam a adesão e transmigração leucocitária. Deste modo o TNF-α promove a expressão das moléculas de adesão, incluindo a E-selectina, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão intercelular vascular (VCAM-1). Além disso, o TNF-α é um potente indutor de

IL-6, IL-1, IL-18 e GM-CSF (BRADLEY, 2008; PAGE; BESTER; PRETORIUS, 2018; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

Tanto a OCP quanto o AH inibiram a liberação de TNF- α ($p < 0,001$) (**Figura 17**). Os dados encontrados são consistentes com aqueles registrados por Gelmini et al. (2013), no qual uma fração purificada de *Copaifera langsdorffii* contendo diterpenos e sesquiterpenos foi capaz de inibir as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α na linhagem THP-1.

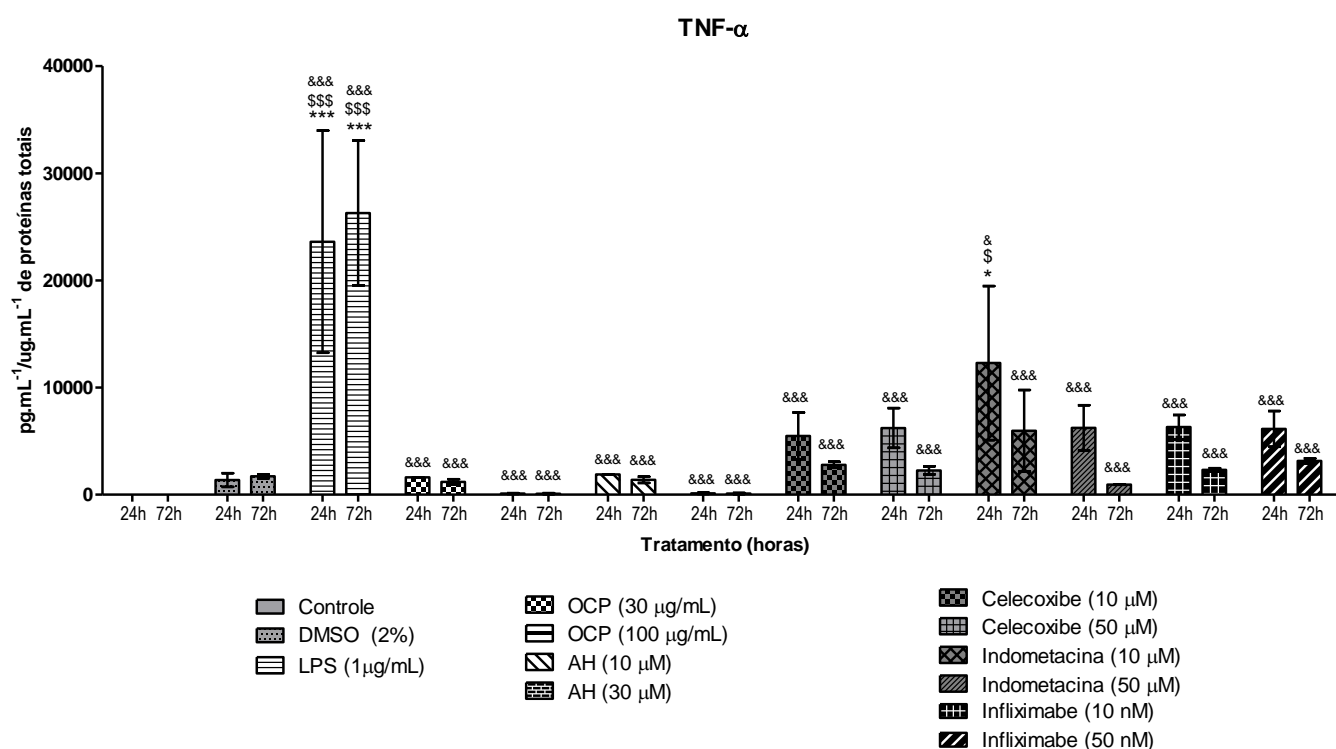


Figura 17. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, ácido *ent*-hardwíckiico, nas concentrações de 10 e 30 μM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 μM , e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF- α (pg/mL por $\mu\text{g/mL}$ de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle ($*p < 0,05$ e $***p < 0,001$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($\$p < 0,05$ e $$$$p < 0,001$) e grupo LPS ($\&p < 0,01$ e $\&\&p < 0,001$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

A IL-10, ao contrário dos outros mediadores, é uma citocina anti-inflamatória, e suas principais atividades parecem ser exercidas por macrófagos (M2) e células dendríticas. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias nessas células, como IL-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α). Portanto, diferentemente dos demais, a inibição dessa citocina não contribui para a diminuição do processo inflamatório, uma vez que a IL-10 participa ativamente do processo de resolução do processo inflamatório com grande atividade imunossupressora, auxiliando ativamente a diminuição de mediadores que participam da fase aguda da inflamação (CAO et al., 2008; O’GARRA et al., 2008; SARAIVA; O’GARRA, 2010).

Nesse sentido, os tratamentos com OCP e AH diminuíram os níveis de IL-10 (**Figura 18**), curiosamente, as oleorresinas de *C. reticulata*, *C. dukey* e *C. multijuga* também exerceram uma ação inibitória significativa na produção de IL-10 (SANTIAGO et al., 2015).

Embora esses dados sejam preliminares e outros mecanismos efetores devam ser investigados, os resultados obtidos indicam que a oleorresina de *C. pubiflora* e o ácido *ent-hardwíckiico* podem estar atuando nas vias do NF- κ B, uma vez que o NF- κ B tem importante papel na regulação dos níveis de IL-10, conforme descrito por vários pesquisadores (BANERJEE et al., 2006; CAO et al., 2008; CHAKRABARTI et al., 2008; VANDEUSEN et al., 2006).

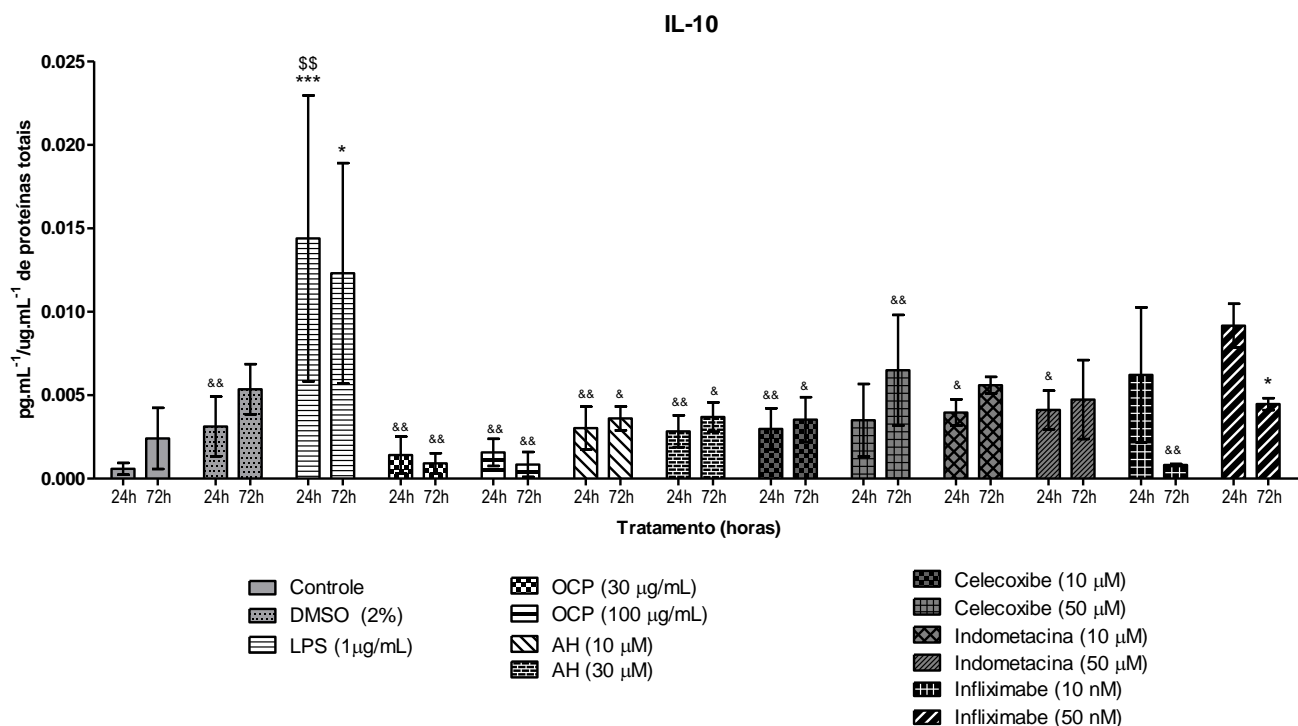


Figura 18. Gráfico do efeito da oleorresina de *Copaifera pubiflora*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido *ent*-hardwíckiico, nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxibe e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximabe, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) na linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) (\$ $p < 0,01$) e grupo LPS (& $p < 0,05$ e && $p < 0,01$). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

4.7 Artrite induzida por zymozan

Conforme citado anteriormente, com exceção da IL-10, os mediadores analisados têm papel essencial na ativação e recrutamento das células para o local da lesão, desencadeando a resposta inflamatória aguda. A redução dos níveis dessas citocinas pode resultar na redução da migração celular. Portanto, para averiguar essa hipótese, a artrite induzida por zimosan foi realizada para compreender os mecanismos de inflamação envolvidos.

O AH e o OCP diminuíram o edema articular e o limiar mecânico durante a artrite experimental ($p < 0,05$) (**Figura 19, A e D**), corroborando com os resultados encontrados nos testes de edema de pata e hiperalgesia induzidos por carragenina. Esses resultados reforçam a sugestão de que o OCP e o AH podem promover mecanismos anti-inflamatórios levando a redução da hipernocicepção. Ademais, os dados apresentados demonstram que AH e OCP foram capazes de diminuir o total de leucócitos nas articulações de camundongos com artrite induzida ($p < 0,05$) (**Figura 19, B**). Além disso, ambas as amostras também diminuíram o número de neutrófilos nas articulações de camundongos com artrite ($p < 0,05$) (**Figura 19, C**). Estudos prévios demonstraram que as oleorresinas de *C. cearensis*, *C. reticulata* e *C. multijuga* inibiram o acúmulo de leucócitos e neutrófilos totais na pleurisia induzida por zymosan. É importante mencionar que o AH é um dos principais metabólitos da *C. Cearensis* (VEIGA et al., 2007). Esses resultados reforçam a hipótese que a OCP e o AH promovam a inibição de mediadores pro-inflamatórios que controlam etapas cruciais na fase aguda da inflamação, como a migração celular.

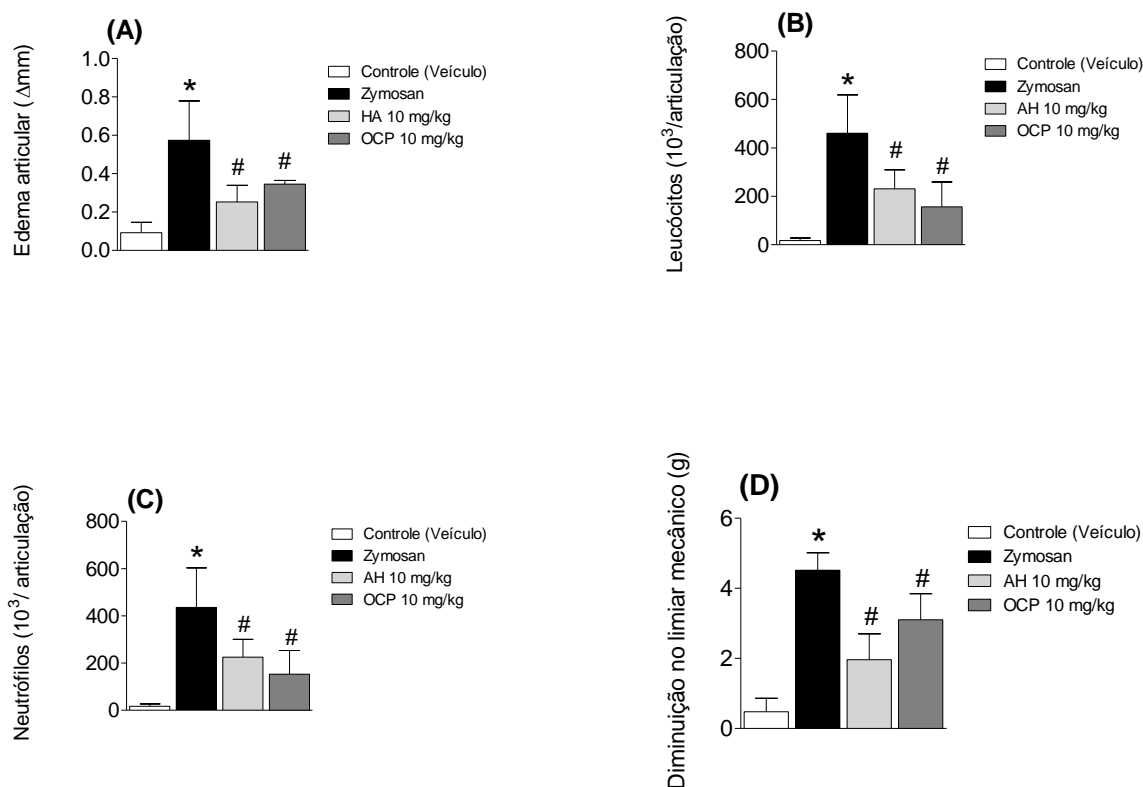


Figura 19. Efeitos anti-inflamatórios *in vivo* do AH e da OCP. **(A)** Efeitos do AH e OCP sobre o edema das articulações. **(B)** Efeitos do tratamento com OCP e AH no número total de leucócitos na articulação de camundongos com artrite. **(C)** Número total de neutrófilos na articulação de camundongos artríticos após o tratamento com AH e OCP. **(D)** Efeitos do AH e OCP no limiar mecânico durante a artrite experimental. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ em comparação com zymosan (one-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8 Atividade específica sobre NF- κ B em macrófagos RAW-264.7-Luc (Ensaio da luciferase)

Para investigar os mecanismos intracelulares pelo qual a OCP e o AH reduzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias foram utilizados macrófagos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 são derivados de leucemia de Abelson induzida por vírus em camundongos Balb/C, sendo amplamente utilizada em estudos *in vitro* para a investigação de atividades anti-inflamatórias. Estas células foram geneticamente modificadas com uma integração estável de um gene repórter de NF- κ B, que resulta na liberação de luciferase. A concentração de luciferase é proporcional a quantidade

de NF- κ B no sobrenadante e interior de células expostas a estímulos, tais como lipopolissacarídeo (LPS) ou peptídeoglicano (PGN) (LICHTMAN et al., 1998).

Como dito anteriormente, a ativação do NF- κ B envolve duas vias de sinalização principais, as vias canônicas e não canônicas (ou alternativas). A via canônica do NF- κ B é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , e está envolvida em quase todos os aspectos das respostas imunes. Por outro lado, a via NF- κ B não canônica parece cooperar com a via NF- κ B canônica para regular as funções específicas do sistema imune adaptativo (LIU et al., 2017).

Na resposta pró-inflamatória, o NF- κ B é um fator de transcrição crucial dos macrófagos M1. É necessário para a expressão de moléculas de adesão, como E-selectina, VCAM-1, ICAM-1 e para a indução de apoptose em alguns tipos de células, síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, IL-12p40 e ciclooxigenase-2 (HAYDEN; GHOSH, 2011).

No ensaio da luciferase, tanto o AH quanto a OCP reduziram significativamente a atividade da luciferase ($p < 0,05$ e $< 0,001$, respectivamente), o que indica uma diminuição na atividade do NF- κ B (**Figura 20, A e C**). Nesse mesmo ensaio a concentração de TNF- α também foi determinada, através da qual, foi possível observar que o AH e a OCP promoveram inibição significativa em seus níveis ($p < 0,05$) (**Figura 20, B e D**).

Em relação ao processo inflamatório, esses resultados são de grande relevância, uma vez que o NF- κ B é um fator de transcrição crucial de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, estudos evidenciaram o potencial dos diterpenoides como agentes anti-inflamatórios devido à sua capacidade de inibir o NF- κ B (DE LAS HERAS; HORTELANO, 2009).

Os resultados obtidos nessa avaliação são condizentes com os resultados obtidos através da análise em sistema multi-spot, onde foi possível aferir que a OCP e o AH inibiram as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ . Outrossim, é possível associar tal resultado com a inibição ao NF- κ B, uma vez que a ativação da via do NF- κ B conduz a iniciação da resposta imune pela produção de citocinas inflamatórias. Assim, é provável que a OCP e o AH interfiram nos processos de sua ativação, impedindo a transcrição de genes que resultam em várias proteínas com atividade pró-inflamatória.

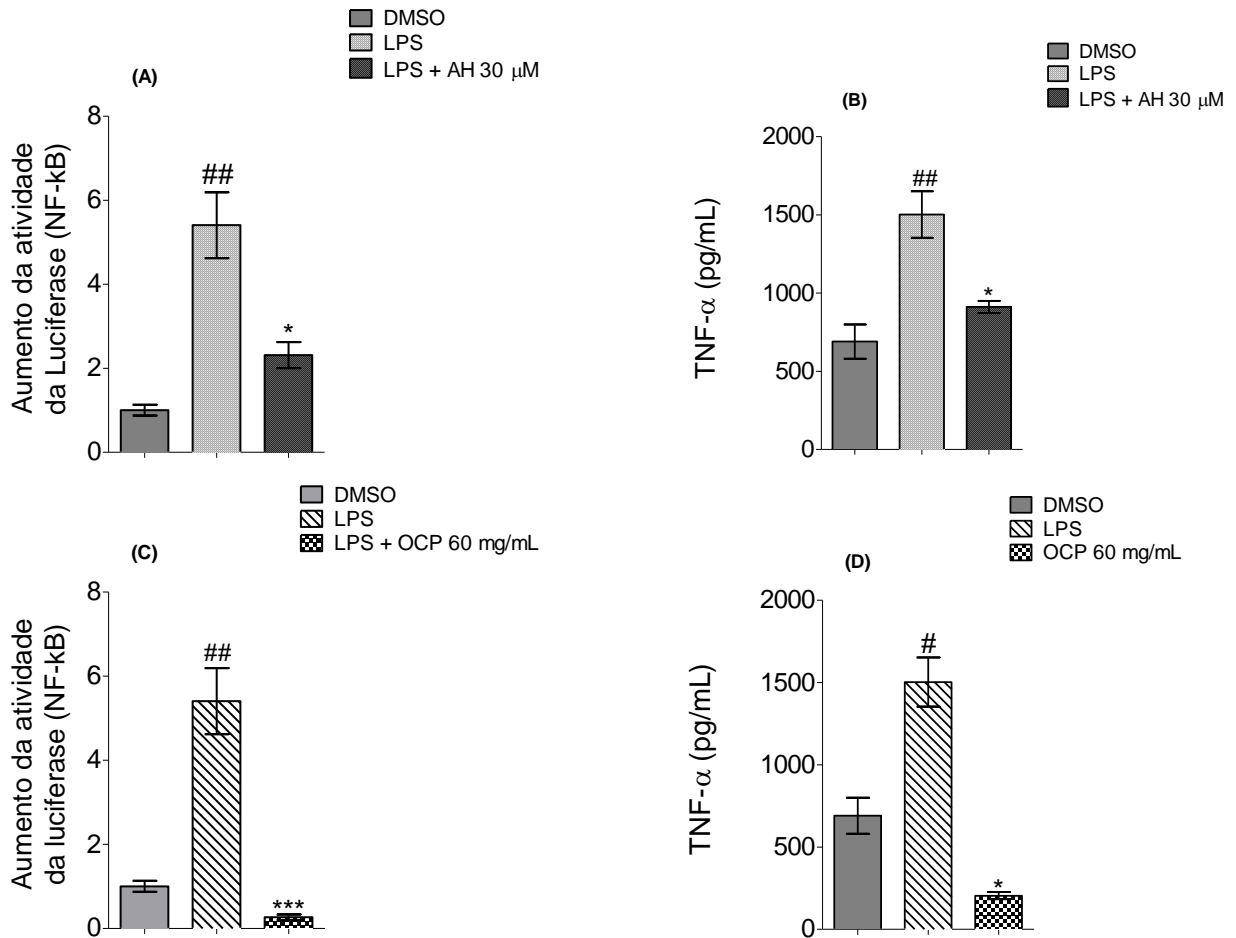


Figura 20. Efeito do tratamento com AH na concentração de 30 μM (A e B) e OCP na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ (C e D) no teste de atividade específica em NF- κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzidos por LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (ensaio de luciferase) e níveis de TNF- α . Cada barra representa a média com E.P.M. * $p < 0,05$, ** e *** $p < 0,001$ comparado ao controle (médio); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em comparação com DMSO.

4.9 Avaliação da nocicepção espontânea produzida por formalina

A nocicepção espontânea produzida por formalina consiste na injeção intraplantar (i.pl) da formalina, que causa a estimulação de nociceptores, induzindo o animal a comportamentos típicos como lambe e/ou morder a pata na qual a formalina foi injetada (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985).

Esse teste é composto de duas fases de nocicepção. A primeira é de origem neurogênica e é observada imediatamente após a injeção de formalina, durando

cerca de 5 min. Nessa fase ocorre a estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente as do tipo C, devido à ação de mediadores, como por exemplo, o glutamato e a substância P (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). A segunda fase é de origem inflamatória, que se inicia 15 min após a administração da formalina e termina em 30 min. A segunda fase resulta da reação inflamatória nos tecidos periféricos que ocorre através da liberação de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas, bradicinina, prostaglandinas, dentre outros (HU et al., 2018; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001).

Nas duas fases do teste da formalina, a OCP e o AH reduziram significativamente o comportamento nociceptivo. As doses de 1, 3 e 10 mg/kg da OCP produziram inibição da dor neurogênica induzida por formalina ($75 \pm 2\%$, $80 \pm 3\%$ e $87 \pm 1\%$, respectivamente, $p < 0,001$). O AH (1, 3 e 10 mg/kg) inibiu $66 \pm 6\%$, $71 \pm 5\%$ e $72 \pm 4\%$, respectivamente, $p < 0,001$ (**Figura 21, A**). Na segunda fase, a OCP (1, 3 e 10 mg/kg) causou inibições máximas de $81 \pm 4\%$, $82 \pm 4\%$ e $87 \pm 1\%$ respectivamente, $p < 0,001$. O AH (1, 3 e 10 mg/kg) apresentou inibições de $73 \pm 6\%$, $77 \pm 5\%$ e $81 \pm 2\%$ respectivamente, $p < 0,001$ (**Figura 21, B**). A indometacina (10 mg/kg) causou inibições máximas de $59 \pm 5\%$ e $76 \pm 6\%$ na primeira e segunda fases, respectivamente ($p < 0,001$). A morfina (5 mg/kg) também produziu inibições significativas de $96 \pm 1\%$ e $99 \pm 1\%$ na primeira e segunda fases, respectivamente ($p < 0,001$).

Na primeira fase do teste, durante a qual ocorre uma estimulação direta da fibra nociceptiva, a administração da OCP e do AH resultou em efeitos superiores ao controle indometacina em todas as doses testadas. Esses resultados, por sua vez, mostram-se mais expressivos se comparados aos resultados obtidos por Gomes et al. (2007), uma vez que as oleorresinas de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, quando avaliadas nesse mesmo teste, não inibiram a primeira fase (neurogênica), apresentando inibição somente da segunda fase, nas doses de 50 e 100 mg/kg.

De acordo com um estudo recente realizado por Cai et al. (2019), o AH é capaz de inibir o canal de sódio do gene SCN9A (Nav1.7), que é altamente expresso em neurônios sensoriais periféricos, desempenhando um papel essencial na regulação da excitabilidade dos neurônios aferentes primários nociceptivos (CAI et al., 2019; DE LERA RUIZ; KRAUS, 2015; HOCKLEY et al., 2017). Portanto, é possível que a ação do AH nesse canal seja responsável pelas altas inibições na primeira fase do teste da

formalina. A redução dos mediadores pró-inflamatórios possivelmente também contribui para a redução da dor inflamatória.

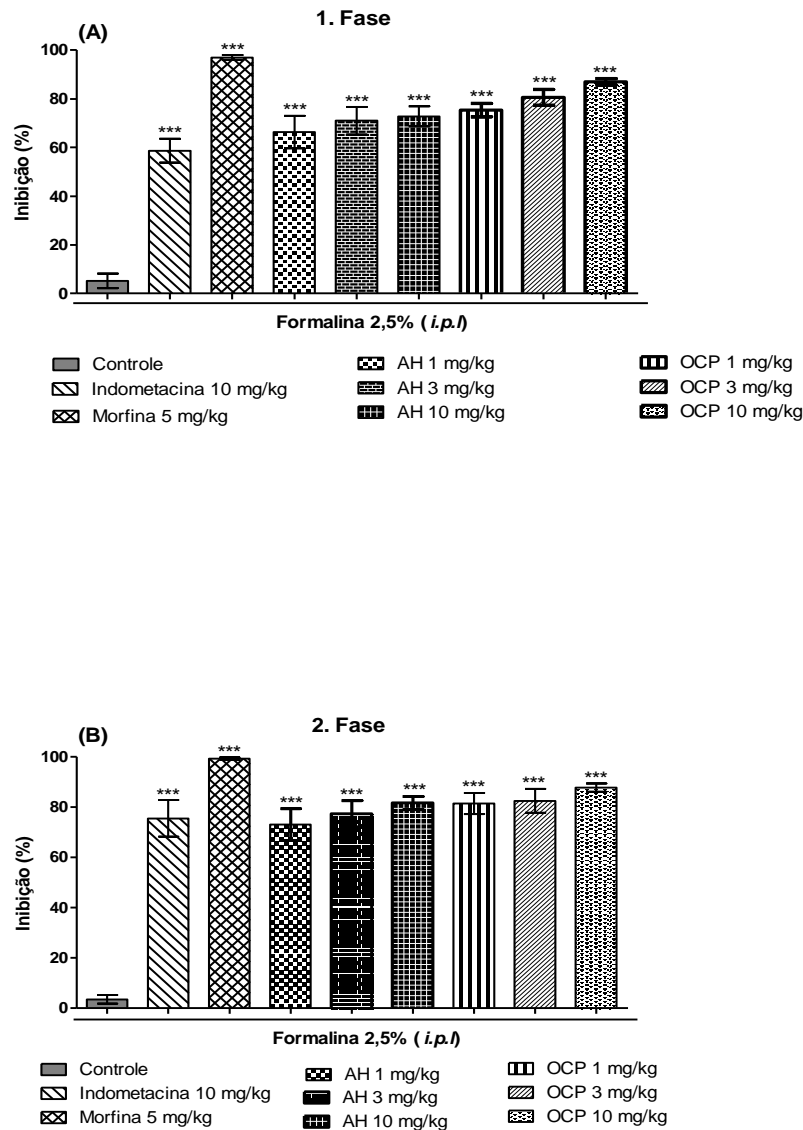


Figura 21. Efeitos da administração de indometacina (10 mg/kg), morfina (5 mg/kg), oleorresina de *Copaifera pubiflora* (1, 3 e 10 mg/kg) e do ácido ent-hardwíckiico (1, 3 e 10 mg/kg) no teste de formalina (2,5%; 20 µL/pata) em camundongos. **(A)** 0-5'; 1ª fase; dor neurogênica, **(B)** 15-30'; 2ª fase; dor inflamatória. Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste *a posteriori* de Dunnett (***p*<0,001).

4.10 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais por ácido acético consiste na administração de um agente irritante na membrana serosa, que causa um comportamento estereotipado em camundongos e ratos, caracterizado por contorções abdominais e falta de coordenação da atividade motora, o que, por sua vez, evidencia dor visceral (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Avalia-se a ação antinociceptiva por dor neurogênica periférica, dor neurogênica central ou dor induzida por liberação de mediadores inflamatórios de maneira não específica.

As contorções evocadas pela injeção de ácido acético foram significativamente reduzidas pelo pré-tratamento com a OCP em doses de 1, 3 e 10 mg/kg ($78 \pm 1\%$; $85 \pm 1\%$ e $86 \pm 2\%$ respectivamente, $p < 0,001$). O AH também apresentou resultados notáveis neste teste, as doses de 1, 3 e 10 mg/kg inibiram $70 \pm 1\%$; $78 \pm 2\%$ e $82 \pm 1\%$, respectivamente $p < 0,001$. O controle indometacina (10 mg/kg) inibiu de $73 \pm 2\%$, $p < 0,001$ (**Figura 22**).

A partir destes resultados, destaca-se que a OCP (1, 3 e 10 mg/kg) e o AH (3 e 10 mg/kg) foram mais eficientes em inibir as contorções do que o controle positivo (indometacina). Comparando esses resultados com os dados descritos por Gomes et al. (2010), as oleorresinas de *C.multijuga* e *C.reticulata* possuem atividades frente ao modelo estudado. Ademais, a oleorresina obtida da *Copaifera duckei* também apresentou respostas significativas quando foi avaliada no teste de contorções abdominais induzida por ácido acético (CARVALHO et al., 2005).

Os resultados encontrados nessa avaliação corroboram com aqueles observados no teste de formalina. Portanto, assim como foi discutido anteriormente, é possível que o efeito antinociceptivo tenha relação com a capacidade do AH em inibir o canal de sódio Nav1.7, sendo tal efeito potencializado pela inibição de mediadores pro-inflamatórios, uma vez que a injeção de ácido acético promove a liberação de mediadores que estão envolvidos no processo inflamatório como a bradicinina, substância P, prostaglandinas, IL-1 β e TNF α , estimulando diretamente os nociceptores quimiosensíveis (BAGDAS et al., 2016; FARRELL; CALLISTER; KEELY, 2014; IKEDA et al., 2001).

Em ambos os testes usados para avaliar a dor, a OCP foi a mais ativa. Tais resultados podem estar relacionados à sua composição química, pois a OCP é

composta por uma mistura de diterpenos (fração não volátil) e sesquiterpenos (fração volátil) que podem interferir na atividade do AH por um efeito sinérgico.

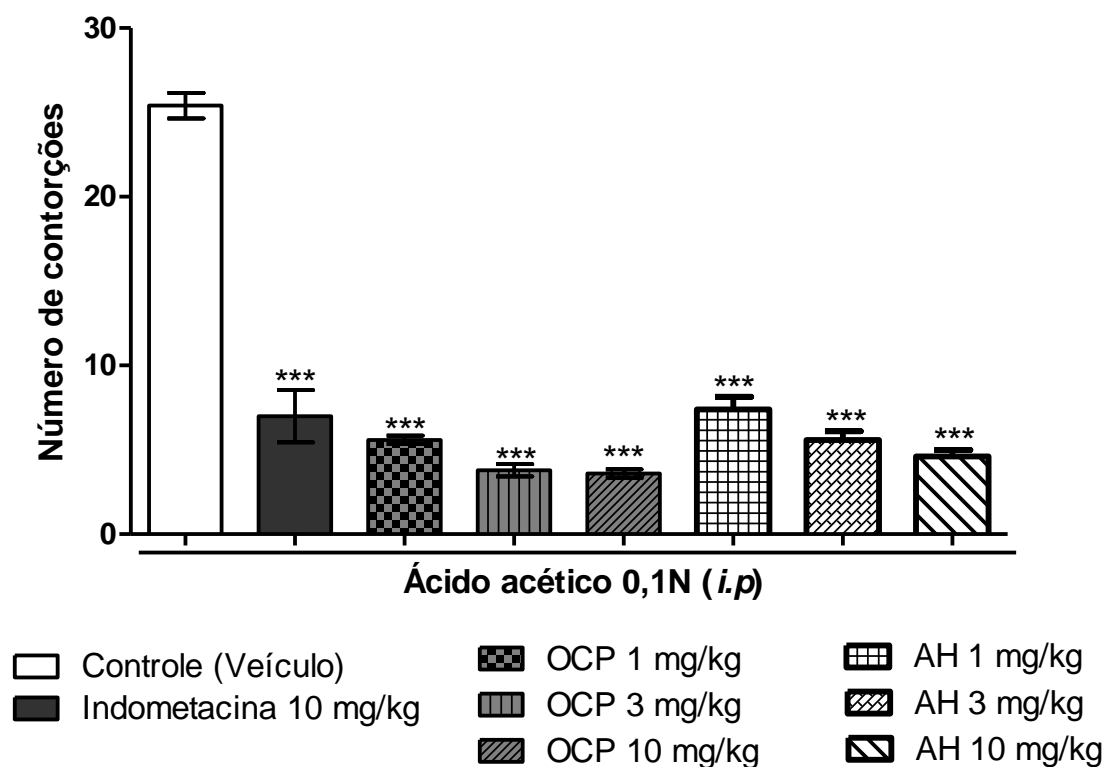


Figura 22. Efeitos da administração de indometacina (10 mg/kg), OCP (1, 3 e 10 mg/kg) e AH (1, 3 e 10 mg/kg) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M. ($n = 6$). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste a posteriori de Dunnett (***) $p < 0,001$).

4.11 Teste de retirada de cauda (*Tail-flick*)

Por fim, o teste do *tail-flick* foi realizado para investigar uma possível ação central causada pela OCP e pelo AH. O teste de *tail-flick* ou teste de retirada da cauda, consiste na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo, que provoca o seu movimento de retirada, caracterizando-

se por uma nocicepção aguda não-inflamatória (MANSOURI; NAGHIZADEH; GHORBANZADEH, 2014).

Para a realização do referido teste, os animais foram colocados no aparelho com a cauda sobre a lâmpada e o tempo que os animais levaram para retirar a cauda após a aplicação do estímulo térmico foi cronometrado. A retirada da cauda acontece através de um movimento reflexo de origem espinhal, rápido e vigoroso em resposta ao estímulo térmico. Substâncias com atividades antinociceptivas que atuam por mecanismos semelhantes aos opioides aumentam o tempo de latência em resposta à este estímulo (ACEVES; MATHAI; HOOK, 2016; CECCHI et al., 2008). O aumento do tempo de resposta é considerado um parâmetro importante para a avaliação da atividade antinociceptiva, já que a resposta envolvida é o bloqueio da nocicepção aguda e não a diminuição do processo inflamatório, tais como os opioides, que não possuem atividade anti-inflamatória, mas atuam por suprimir a resposta de neurônios espinhais.

A administração da OCP e do AH (10 mg/kg) não afetou significativamente as latências de retirada da cauda em camundongos ($30 \pm 2\%$ e $29 \pm 1\%$, respectivamente) em comparação com a morfina utilizada como controle ($72 \pm 1\%$, $p < 0,001$) (**Fig 23, A**). A administração concomitante da OCP e do AH com a naloxona afetaram as latências da retirada da cauda apenas parcialmente ($38 \pm 2\%$ e $30 \pm 1\%$, respectivamente), mas por outro lado, a naloxona antagonizou os efeitos da morfina (**Fig. 23, B**). Assim, podemos sugerir que a oleorresina de *C. pubiflora* e o ácido *ent-hardwíckiico* não possuem efeitos antinociceptivos sobre o sistema nervoso central, já que seu efeito não foi alterado com a administração de um antagonista de receptor de opioide, a naloxona (ACEVES; MATHAI; HOOK, 2016; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Esse mesmo comportamento ocorre com os anti-inflamatórios não esteroidais, como diclofenaco, ibuprofeno e indometacina, uma vez que não sofrem os efeitos antagonistas da naloxona, já que seus mecanismos antinociceptivos interferem em outras vias como, por exemplo, na inibição das enzimas COX-1 e COX-2 (DOGRUL et al., 2007; HERNÁNDEZ-DELGADILLO; CRUZ, 2006).

Desta forma, os resultados obtidos no ensaio de retirada de cauda demonstram que a resposta antinociceptiva apresentada pela OCP e pelo AH nos testes de nocicepção espontânea produzida por formalina e de contorções abdominais

induzidas por ácido acético possivelmente ocorrem devido à redução dos mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização dos nociceptores.

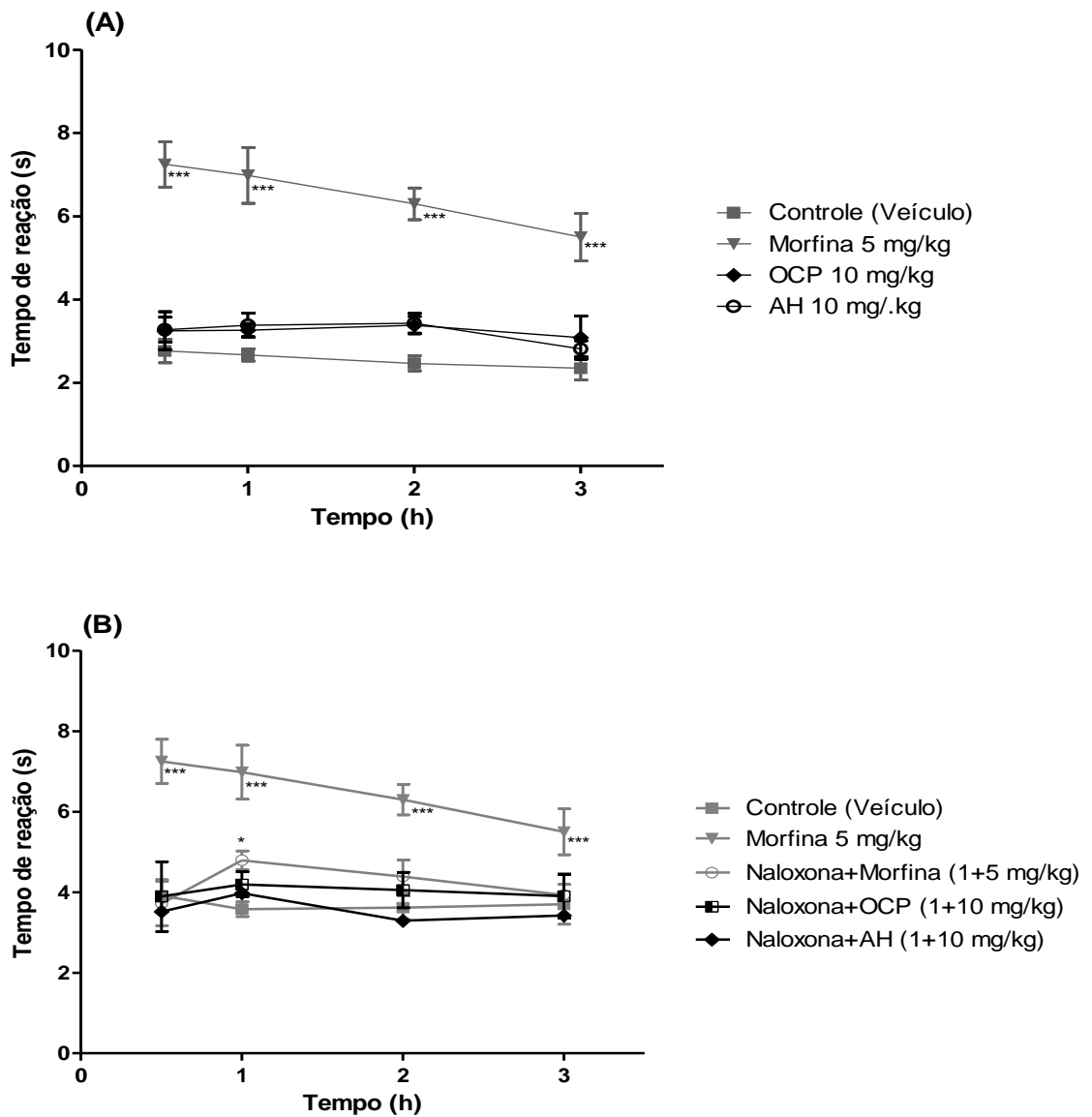


Figura 23. Efeitos da administração de morfina (5 mg/kg), naloxona (1 mg/kg) e OCP (1, 3 e 10 mg/kg) e AH (1, 3 e 10 mg/kg) por injeção de formalina (2,5%; 20 μ L/pata) em camundongos para resposta nociceptiva no teste de movimento da cauda. **(A)** Efeitos da OCP (1, 3 e 10 mg/kg), AH (1, 3 e 10 mg/kg) e morfina (5 mg/kg). **(B)** Efeitos da morfina (5 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg), OCP (10 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg) e AH (10 mg/kg) com naloxona (1 mg/kg). Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle, ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni (* p <0,05, e *** p <0,001).

Os resultados obtidos neste estudo são corroborados pelos resultados de outros estudos publicados na literatura, nos quais podemos aferir que as substâncias presentes nas oleorresinas de *Copaifera* spp. apresentam atividade anti-inflamatória (ARRUDA et al., 2019; CASTRO GHIZONI et al., 2017; GOMES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2018; SANTIAGO et al., 2015; SÍMARO et al., 2020). Ademais é importante ressaltar que os resultados apresentados no presente estudo foram recentemente publicados (SÍMARO et al., 2021).

Portanto, através dos ensaios realizados, foi possível observar que a oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth, bem como seu metabólito majoritário ácido *ent-hardwíckiico* provavelmente exerçam seus efeitos mediante a inibição da ativação da via do NF- κ B e assim, diminuem as concentrações de algumas citocinas, como INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . Entretanto, não podemos descartar que a OCP e o AH possam atuar sobre a modulação da transmissão do sinal nociceptivo a nível periférico, sendo necessário mais estudos para a confirmação desta hipótese.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou as atividades analgésica e anti-inflamatória da oleorresina de *Copaifera pubiflora Benth* (OCP) e seu principal metabólito ácido *ent-hardwíckiiico* (AH) usando ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. Ambos exibiram atividades analgésicas e anti-inflamatórias significativas nas doses testadas. Nossos achados sugerem que a OCP e o AH podem inibir a produção de citocinas inflamatórias suprimindo a via de sinalização de NF- κ B. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar seu exato mecanismo de ação. Também foi demonstrado que a OCP e o AH não foram citotóxicos para as linhagens de células normais e tumorais testadas. Assim, o presente estudo validou o uso da oleorresina de *C. pubiflora* no tratamento da dor e dos distúrbios inflamatórios, fornecendo a base farmacológica para seu uso tradicional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVES, M.; MATHAI, B. B.; HOOK, M. A. Evaluation of the effects of specific opioid receptor agonists in a rodent model of spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 54, n. 10, p. 767–777, 2016.

ALBUQUERQUE, K. C. O. DE; DA VEIGA, A. D. S. S.; DA SILVA E SILVA, J. V.; BRIGIDO, H. P. C.; FERREIRA, E. P. D. R.; COSTA, E. V. S.; MARINHO, A. M. D. R.; PERCÁRIO, S.; DOLABELA, M. F. Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with *Copaifera*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

ALENCAR, J. D. C. **Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina** *Acta Amazonica*, 1982.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, mar. 2004.

ALON, R.; FUHLBRIGGE, R. C.; FINGER, E. B.; SPRINGER, T. A. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. **The Journal of Cell Biology**, v. 135, n. 3, p. 849–65, nov. 1996.

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. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262–10277, 2018.

APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 197–263, jun. 1998.

ARRUDA, C.; ALDANA MEJÍA, J. A.; RIBEIRO, V. P.; GAMBETA BORGES, C. H.; GOMES MARTINS, C. H.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1–20, 2019.

BAGDAS, D.; MULDOON, P. P.; ALSHARARI, S.; CARROLL, F. I.; NEGUS, S. S.; DAMAJ, M. I. Expression and pharmacological modulation of visceral pain-induced conditioned place aversion in mice. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 236–243, 2016.

BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y.; FIELDS, H. L.; APKARIAN, A. V. Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. **Neuron**, v. 66, n. 1, p. 149–60, apr. 2010.

BALLANTYNE, J. C.; MAO, J. Opioid therapy for chronic pain. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 20, p. 1943–53, nov. 2003.

BANERJEE, A.; GUGASYAN, R.; MCMAHON, M.; GERONDAKIS, S. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3274–3279, 2006.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain - a clinical perspective. **Nature Clinical Practice. Neurology**, v. 2, n. 2, p. 95–106, mar. 2006.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, oct. 2009.

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

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 2003.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, apr. 2006.

BEZERRA CARVALHO, A. C.; RAMALHO, L. S.; DE OLIVEIRA MARQUES, R. F.; SILVÉRIO PERFEITO, J. P. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. PART B, p. 503–506, sept. 2014.

BHOOLA, K. D.; OVERVIEW, I. Bioregulation of Kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 1–80, mar. 1992.

BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, nov. 2006.

BRADLEY, C.; PERCHET, C.; LELEKOV-BOISSARD, T.; MAGNIN, M.; GARCIA-LARREA, L. Not an Aspirin: No Evidence for Acute Anti-Nociception to Laser-Evoked

Pain after Motor Cortex rTMS in Healthy Humans. **Brain Stimulation**, v. 9, n. 1, p. 48–57, feb. 2015.

BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 231–241, jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 mai. 2014.

BUFAINO, E. M. Phytotherapy in Brazil: Recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 22–27, feb. 2013.

BURGESS, S. E.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H.; MALAN-JÚNIOR, T. P.; VANDERAH, T. W.; LAI, J.; PORRECA, F. Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 5129–36, jun. 2002.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 139–154, apr. 2005.

BURNS, R. N.; SINGH, M.; SENATOROV, I. S.; MONIRI, N. H. Mechanisms of homologous and heterologous phosphorylation of FFA receptor 4 (GPR120): GRK6 and PKC mediate phosphorylation of Thr347, Ser 350, and Ser357 in the C-terminal tail. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 650–659, feb. 2014.

CAI, S.; BELLAMPALLI, S. S.; YU, J.; LI, W.; JI, Y.; WIJERATNE, E. M. K.; DORAME, A.; LUO, S.; SHAN, Z.; KHANNA, M.; MOUTAL, A.; STREICHER, J. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; KHANNA, R. (-)-Hardwickiiic Acid and Hautriwaic Acid Induce Antinociception via Blockade of Tetrodotoxin-Sensitive Voltage-Dependent Sodium Channels. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 1716–1728, mar. 2019.

CAO, S.; ZHANG, X.; EDWARDS, J. P.; MOSSER, D. M. NF- κ B1 (p50) Homodimers Differentially Regulate Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

CARNEIRO, L. J.; TASSO, T. O.; SANTOS, M. F. C.; GOULART, M. O.; BASTOS, J. K.; PARREIRA, R. L. T.; ORENHA, R. P.; VENEZIANI, R. C. S. Copaifera multijuga, Copaifera pubiflora and Copaifera trapezifolia Oleoresins: Chemical Characterization and in vitro Cytotoxic Potential against Tumoral Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 00, p. 1–11, sep. 2020.

CARVALHO, B.; CLARK, D. J.; ANGST, M. S. Local and systemic release of cytokines, nerve growth factor, prostaglandin E2, and substance P in incisional wounds and serum following cesarean delivery. **The journal of pain : official journal**

of the American Pain Society, v. 9, n. 7, p. 650–7, jul. 2008.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, nov. 2005.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137–158, 1998.

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**, v. 118, n. 10, p. 3409–3423, oct. 2017.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388–392, mar. 2006.

CECCHI, M.; CAPRILES, N.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Differential responses to morphine-induced analgesia in the tail-flick test. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 2, p. 146–151, mar. 2008.

CHAKRABARTI, A.; SADLER, A. J.; KAR, N.; YOUNG, H. A.; SILVERMAN, R. H.; WILLIAMS, B. R. G. Protein kinase R-dependent regulation of interleukin-10 in response to double-stranded RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 37, p. 25132–25139, sep. 2008.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13926–31, oct. 2002.

CHAPMAN, C. R.; TUCKETT, R. P.; SONG, C. W. Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 2, p. 122–45, feb. 2008.

CHAPON, A.; PERCHET, C.; GARCIA-LARREA, L.; FROT, M. Hyperalgesia when observing pain-related images is a genuine bias in perception and enhances autonomic responses. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, oct. 2019.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, nov. 2010.

CHEN, H.-S.; LEI, J.; HE, X.; QU, F.; WANG, Y.; WEN, W.-W.; YOU, H.-J.; ARENDT-NIELSEN, L. Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. **Pain**, v. 135, n. 1–2, p. 31–6, mar. 2008.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, feb. 1968.

COOPER, Z. A.; GHOSH, A.; GUPTA, A.; MAITY, T.; BENJAMIN, I. J.; VOGEL, S. N.; HASDAY, J. D.; SINGH, I. S. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS-stimulated macrophages by differentially modifying NF- κ B recruitment to cytokine gene promoters. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 298, n. 1, oct. 2010.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.-C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, Bone, Spine**, v. 72, n. 5, p. 359–71, oct. 2005.

CRENTSIL, J. A.; YAMTHE, L. R. T.; ANIBEA, B. Z.; BRONI, E.; KWOFIE, S. K.; TETTEH, J. K. A.; OSEI-SAFO, D. Leishmanicidal Potential of Hardwickiic Acid Isolated From *Croton sylvaticus*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–15, may. 2020.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 392–402, jul. 1971.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–60, jan. 2005.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, n. 1, p. 74–78, may. 1941.

D'ARMOUR, F. SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 27, n. c, p. 117–120, 1992.

DA SILVA, J. J. M.; CREVELIN, E. J.; CARNEIRO, L. J.; ROGEZ, H.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BERALDO MORAES, L. A.; BASTOS, J. K. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of**

Chromatography A, v. 1515, p. 81–90, sep. 2017.

DA SILVA, J. J. M.; PENA RIBEIRO, V.; LEMOS, M.; MILLER CROTTI, A. E.; ROGEZ, H.; KENUPP BASTOS, J. Reliable Methods for Analyses of Volatile Compounds of *Copaifera* Oleoresins Combining Headspace and Gas Chromatography. **Chemistry and Biodiversity**, v. 17, n. 1, p. e1900440, jan. 2020.

DA SILVA MEDEIROS, R.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 3, p. 282–288, jul. 2008.

DALENOGARE, D. P.; FERRO, P. R.; DE PRÁ, S. D. T.; RIGO, F. K.; DE DAVID ANTONIAZZI, C. T.; DE ALMEIDA, A. S.; DAMIANI, A. P.; STRAPAZZON, G.; DE OLIVEIRA SARDINHA, T. T.; GALVANI, N. C.; BOLIGON, A. A.; DE ANDRADE, V. M.; DA SILVA BRUM, E.; OLIVEIRA, S. M.; TREVISAN, G. Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 829–844, may. 2019.

DALMARCO, E. M.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNFalpha and IL-1 beta levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Cell adhesion & migration**, v. 2, n. 4, p. 231–235, oct. 2008.

DE LAS HERAS, B.; HORTELANO, S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 28–39, mar. 2009.

DE FILIPPO, K.; DUDECK, A.; HASENBERG, M.; NYE, E.; VAN ROOIJEN, N.; HARTMANN, K.; GUNZER, M.; ROERS, A.; HOGG, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. **Blood**, v. 121, n. 24, p. 4930–4937, jun. 2013.

DE LERA RUIZ, M.; KRAUS, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 7093–7118, may. 2015.

DE OLIVEIRA, S.; REYES-ALDASORO, C. C.; CANDEL, S.; RENSHAW, S. A.; MULERO, V.; CALADO, Â. Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4349–4359, mar. 2013.

DE S. VARGAS, F.; D. O. DE ALMEIDA, P.; ARANHA, E.; DE A. BOLETI, A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M.; JUNIOR, V.; LIMA, E. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, apr. 2015.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W.; KEPPLER, D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4723, p. 330–2, oct. 1985.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 340–2, oct. 1968.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, jan. 2018.

DOGRUL, A.; GÜLMEZ, S. E.; DEVECI, M. S.; GUL, H.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F.; TULUNAY, F. C. The local antinociceptive actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the mouse radiant heat tail-flick test. **Anesthesia and Analgesia**, v. 104, n. 4, p. 927–935, may. 2007.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125–131, aug. 1995.

DUBNER, R.; GOLD, M. The neurobiology of pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. July, p. 7627–7630, 1999.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161–174, dec. 1977.

DUTRA, R. C.; BENTO, A. F.; LEITE, D. F. P.; MANJAVACHI, M. N.; MARCON, R.; BICCA, M. A.; PESQUERO, J. B.; CALIXTO, J. B. The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes. **Neurobiology of Disease**, v. 54, p. 82–93, jun. 2013.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, oct. 2016.

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, jul. 2014.

FARRELL, K. E.; CALLISTER, R. J.; KEELY, S. Understanding and targeting centrally mediated visceral pain in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1–4, mar. 2014.

FENIMORE, J.; YOUNG, H. A. Regulation of IFN- γ expression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 941, p. 1–19, 2016.

FERNANDES, G. W. et al. Dismantling Brazil's science threatens global biodiversity heritage. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 3, p. 239–243, sep 2017.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; CALIXTO, J. B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188–1197, dec. 2002.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 565–75, jul. 2004.

FINEGOLD, A. A.; MANNES, A. J.; IADAROLA, M. J. A paracrine paradigm for in vivo gene therapy in the central nervous system: treatment of chronic pain. **Human Gene Therapy**, v. 10, p. 1251–7, may. 1999.

FLORES, E. N.; DUGGAN, A.; MADATHANY, T.; HOGAN, A. K.; MÁRQUEZ, F. G.; KUMAR, G.; SEAL, R. P.; EDWARDS, R. H.; LIBERMAN, M. C.; GARCÍA-AÑOVEROS, J. A Non-canonical Pathway from Cochlea to Brain Signals Tissue-Damaging Noise. **Current Biology**, v. 25, n. 5, p. 606–612, mar. 2015.

FRANK, M. M.; FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunology today**, v. 12, n. 9, p. 322–326, sep. 1991.

FUCHS, P. N.; CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Secondary hyperalgesia persists in capsaicin desensitized skin. **Pain**, v. 84, n. 2–3, p. 141–9, mar. 2000.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129–41, jan. 1999.

FURTADO, R. A.; DE OLIVEIRA, P. F.; SENEDESE, J. M.; OZELIN, S. D.; DE SOUZA, L. D. R.; LEANDRO, L. F.; DE OLIVEIRA, W. L.; DA SILVA, J. J. M.; OLIVEIRA, L. C.; ROGEZ, H.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 221, p. 119–125, jul. 2018.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232–241, fev. 2010.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 729–37, jan. 2004.

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**, v. 440, n. 2, p. 170–178, jan. 2013.

GILCHRIST, M.; BEFUS, A. D. Interferon- γ regulates chemokine expression and release in the human mast cell line HMC1: Role of nitric oxide. **Immunology**, v. 123, n. 2, p. 209–217, feb. 2008.

GOADSBY, P. J.; LIPTON, R. B.; FERRARI, M. D. Migraine--current understanding and treatment. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 4, p. 257–270, jan. 2002.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248–1257, out. 2010.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. D. M.; FONTES, S. P.; HOVELL, A. M. C.; LANDGRAF, R. G.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. D. C.; FERNANDES, P. D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179–184, sep. 2008.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. M. DE; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. D. C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. Gomes, N.D.M., Rezende, C.M. De, Fontes, S.P., Matheus, M.E., Pinto, A.D.C., Fernandes, P.D., 2010. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, mar. 2010.

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, jan. 2007.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ-LORENZANA, G.; ROJAS-PILONI, G.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, J.; HERNÁNDEZ-LINARES, Y.; VILLANUEVA, L.; CONDÉS-LARA, M. Spinal LTP induced by sciatic nerve electrical stimulation enhances posterior triangular thalamic nociceptive responses. **Neuroscience**, v. 234, p. 125–34, mar. 2013.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 54, n. 4, p. 469–487, jan. 2003.

GWAK, Y. S.; HULSEBOSCH, C. E. Neuronal hyperexcitability: a substrate for central neuropathic pain after spinal cord injury. **Current Pain and Headache Reports**, v. 15, n. 3, p. 215–22, jun. 2011.

HAENEY, M. R. The role of the complement cascade in sepsis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41 Suppl A, p. 41–6, sep. 1998.

HALL, C. S.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. **Publications in Psychology, University of California**, v. 6, p. 1–12, 1932.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell Research**, v. 21, n. 2, p. 223–244, dec. 2011.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, feb. 1990.

HERBERT, M. K.; JUST, H.; SCHMIDT, R. F. Histamine excites groups III and IV afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neurosci Lett**, v. 305, n. 2, p. 95–98, jun. 2001.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G. P.; CRUZ, S. L. Endogenous opioids are involved in morphine and dipyron analgesic potentiation in the tail flick test in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, n. 1–3, p. 54–59, sep. 2006.

HEVKO, J. M.; MURPHY, R. C. Formation of Murine Macrophage-derived 5-Oxo-7-glutathionyl-8,11,14-eicosatrienoic acid (FOG7) Is Catalyzed by Leukotriene C4 Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7037–7043, mar. 2002.

HOCKLEY, J. R. F.; GONZÁLEZ-CANO, R.; MCMURRAY, S.; TEJADA-GIRALDEZ, M. A.; MCGUIRE, C.; TORRES, A.; WILBREY, A. L.; CIBERT-GOTON, V.; NIETO, F. R.; PITCHER, T.; KNOWLES, C. H.; BAEYENS, J. M.; WOOD, J. N.; WINCHESTER, W. J.; BULMER, D. C.; CENDÁN, C. M.; MCMURRAY, G. Visceral and somatic pain modalities reveal NaV1.7-independent visceral nociceptive pathways. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 8, p. 2661–2679, apr. 2017.

HOFMAN, Z.; DE MAAT, S.; HACK, C. E.; MAAS, C. Bradykinin: Inflammatory Product of the Coagulation System. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 51, n. 2, p. 152–161, dec. 2016.

HONORE, P.; KAGE, K.; MIKUSA, J.; WATT, A. T.; JOHNSTON, J. F.; WYATT, J. R.; FALTYNEK, C. R.; JARVIS, M. F.; LYNCH, K. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. **Pain**, v. 99, n. 1–2, p. 11–9, set. 2002.

HU, Z. J.; HAN, W.; CAO, C. Q.; MAO-YING, Q. L.; MI, W. L.; WANG, Y. Q. Peripheral

Leptin Signaling Mediates Formalin-Induced Nociception. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 321–329, mar. 2018.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69–76, jun. 1985.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. Peptide and non-peptide-contraining unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. February, p. 83–91, feb. 2001.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911–2919, 2001.

JENSEN, T. S.; GEBHART, G. F. New pain terminology: a work in progress. **Pain**, v. 140, n. 3, p. 399–400, dez. nov. 2008.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 302–304, apr. 1968.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 25–29, jan. 2003.

KHALIL, M.; ALLIGER, K.; WEIDINGER, C.; YERINDE, C.; WIRTZ, S.; BECKER, C.; ENGEL, M. A. Functional role of transient receptor potential channels in immune cells and epithelia. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–7, feb. 2018.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871–1882, aug. 2014.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

KOPITAR-JERALA, N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 873, jul. 2017.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KOSTER, F. T.; MCGREGOR, D. D.; MACKANESS, M. B. The mediator of cellular immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 133, n. 2, p. 400–9, feb. 1971.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412–7, jan. 1959.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816–827, feb. 2015.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Dor Neuropática – Aspectos Neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 5, p. 492–505, 2008.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–66, nov. 2010.

LABUZ, D.; SPAHN, V.; CELIK, M. Ö.; MACHELSKA, H. Opioids and TRPV1 in the peripheral control of neuropathic pain – defining a target site in the injured nerve. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 330–340, feb. 2015.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, dec. 2001.

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

LEMONS, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; DE SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 3, p. 238–245, 2015.

LI, J.-L.; FUJIYAMA, F.; KANEKO, T.; MIZUNO, N. Expression of vesicular glutamate transporters , VGluT1 and VGluT2 , in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 457, n. 3, p. 236–49, mar. 2003.

LI, R.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 10, p. 1166–1226, jul. 2016.

LI, Z. P.; HU, J. F.; SUN, M. N.; JI, H. J.; ZHAO, M.; WU, D. H.; LI, G. Y.; LIU, G.; CHEN, N. H. Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 661,

n. 1–3, p. 118–123, apr. 2011.

LICHTMAN, S. N.; WANG, J.; LEMASTERS, J. J.; HILL, C.; CAROLINA, N.; STEVEN, N.; WANG, J.; LEMAS-, J. J. LPS receptor CD14 participates in release of TNF-alpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in kupffer cells. **The American Journal of Physiology**, n. 10, p. 39–46, jul. 1998.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131–4, jan. 2003.

LIMA, S. R. M.; VEIGA, 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, nov. 2003.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. e17023, jul. 2017.

LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A.; RIVERA, S.; BLANCHARD, R. K.; AYDEMIR, T. B.; KNUTSON, M. D.; GANZ, T.; COUSINS, R. J. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 19, p. 6843–6848, may. 2005.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–7, jul. 2008.

LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S. M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: A revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658–1661, jun. 2012.

MACGLASHAN, D. Histamine: A mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. S53-9, 2003.

MAGERL, W.; FUCHS, P. N.; MEYER, R. A.; TREEDE, R.-D. Roles of capsaicin-insensitive nociceptors in cutaneous pain and secondary hyperalgesia. **Brain**, v. 124, n. Pt 9, p. 1754–64, sep. 2001.

MANCINI, J. A; BLOOD, K.; GUAY, J.; GORDON, R.; CLAVEAU, D.; CHAN, C. C.; RIENDEAU, D. Cloning, Expression, and Up-regulation of Inducible Rat Prostaglandin E Synthase during Lipopolysaccharide-induced Pyresis and Adjuvant-induced Arthritis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4469–4475, feb. 2001.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 120, p. 43–49, may. 2014.

MARTIN, A.; CLYNES, M. Acid phosphatase: endpoint for *in vitro* toxicity tests. **In vitro celular & Developmental Biology**, v. 27A, n. 3, part 1, p. 183–184, mar. 1991.

MARTIN, A.; CLYNES, M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. **Cytotechnology**, v. 11, n. 1, p. 49–58, 1993.

MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of croton sonderianus, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1625–1633, nov. 1991.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–35, jul. 2008.

MENENDEZ, M. E.; RING, D. Factors associated with greater pain intensity. **Hand Clinics**, v. 32, n. 1, p. 27–31, feb. 2016.

MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 247–252, 1979.

MERTENS, P.; BLOND, S.; DAVID, R.; RIGOARD, P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neuro-Chirurgie**, v. 61 Suppl 1, p. S22-34, jun. 2015.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, jan.1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, apr. 2002.

MISCHKOWSKI, D.; PALACIOS-BARRIOS, E. E.; BANKER, L.; DILDINE, T. C.; ATLAS, L. Y. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses - Corrected and republished. **Pain**, v. 160, n. 6, p. 1469–1481, may. 2019.

MITTAL, A.; SAGI, V.; GUPTA, M.; GUPTA, K. Mast cell neural interactions in health and disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 1–6, mar. 2019.

MÜLLER, E.; CHRISTOPOULOS, P. F.; HALDER, S.; LUNDE, A.; BERAKI, K.; SPETH, M.; ØYNEBRÅTEN, I.; CORTHAY, A. Toll-like receptor ligands and interferon- γ synergize for induction of antitumor M1 macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. oct. 2017.

NAKAMURA, M. T.; ENDO, E. H.; DE SOUSA, J. P. B.; CALLEJON, D. R.; UEDANAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; DE FREITAS, O.; NAKAMURA, C. V.; LOPES,

N. P. Copaiba oil and its constituent copalic acid as chemotherapeutic agents against dermatophytes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1377–1383, nov. 2017.

NEWMAN, A. A. Chemistry of Terpenes and Terpenoids. **Science**, v. 179, n. 4069, p. 171–171, jan. 1973.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, feb. 2016.

O'GARRA, A.; BARRAT, F. J.; CASTRO, A. G.; VICARI, A.; HAWRYLOWICZ, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 114–131, jun. 2008.

O'GARRA, A.; BARRAT, F. J.; CASTRO, A. G.; VICARI, A.; HAWRYLOWICZ, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 114–131, jun. 2008.

OLIVEIRA, D. C. DE; DRUMMOND, M. M.; MOREIRA, A. S. F. P.; SOARES, G. L. G.; ISAIAS, R. M. D. S. Potencialidades morfogênicas de *Copaifera langsdorffii* Desf.(Fabaceae): super-hospedeira de herbívoros galhadores. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 10, feb. 2009.

PAGE, M. J.; BESTER, J.; PRETORIUS, E. The inflammatory effects of TNF- α and complement component 3 on coagulation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, jan. 2018.

PASA, M. C. Diversity and use of plants cultivated in the community cinturão colina verde, cuiaba - mt, brazil. p. 84–93, 2015.

PEDROLLO, C. T.; KINUPP, V. F. Sustainability or colonialism? Legislative obstacles to research and development of natural products and patents on traditional knowledge in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 3, p. 452–456, jul. 2015.

PFEIFER BARBOSA, A. L.; WENZEL-STORJOHANN, A.; BARBOSA, J. D.; ZIDORN, C.; PEIFER, C.; TASDEMIR, D.; ÇIÇEK, S. S. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, apr. 2019.

PIERI, F. A.; MARTINS MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; SCATAMBURLO MOREIRA, M. A.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36–38, 2012a.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A S. Óleo de copaiba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista**

Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PIERI, F. A.; SILVA, V. O.; SOUZA, C. F.; COSTA, J. C. M.; SANTOS, L. F.; MOREIRA, M. A S. Antimicrobial profile screening of two oils of copaifera genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241–244, feb. 2012b.

PINHEIRO, J. G. DE O.; TAVARES, E. DE A.; DA SILVA, S. S.; SILVA, J. F.; DE CARVALHO, Y. M. B. G.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJ, A. A. DE S.; BARBOSA, E. G.; PEDROSA, M. DE F. F.; SOARES, L. A. L.; DE AZEVEDO, E. P.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F.; DE LIMA, Á. A. N. Inclusion complexes of copaiba (*Copaifera multijuga* hayne) oleoresin and cyclodextrins: Physicochemical characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 355–360, nov. 2000.

PINTO, L. G.; CUNHA, T. M.; VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; VERRI, W. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247–256, feb. 2010.

PLATNICH, J. M.; MURUVE, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 670, n. December 2018, p. 4–14, dec. 2019.

PONTES, A. B.; CORREIA, D. Z.; COUTINHO, M. S.; MONTHÉ, C. G. Emulsão dermatológica à base de copaíba. **Revista Analytica**, v. 7, p. 36–42, 2003.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 319–25, jun. 2002.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–338, may. 2004.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): An overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, p. 295–307, jul. 2013.

PRISINZANO, T.; ROTHMAN, R. Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 23, n. 1, p. 1–7, may. 2008.

REGOLIT, D.; BARABEF, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological Reviews**, v. 32, n. 1, p. 1-46, mar. 1980.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–8, jan. 2000.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, dec. 2018.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für heumatologie**, v. 60, n. 6, p. 404–15, dec. 2001.

ROBERTS, W. G.; PALADE, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 6, p. 2369–79, jun. 1995.

ROECKEL, L. A.; LE COZ, G. M.; GAVÉRIAUX-RUFF, C.; SIMONIN, F. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 338, p. 160–182, dec. 2016.

ROSEN, S. D. Cell surface lectins in the immune system. **Seminars in Immunology**, v. 5, n. 4, p. 237–47, aug. 1993.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. 1–3, p. 396–401, sep. 2011.

SAHBAIE, P.; SHI, X.; GUO, T.-Z.; QIAO, Y.; YEOMANS, D.; KINGERY, W.; CLARK, D. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. **Pain**, v. 145, n. 3, p. 341–349, aug. 2010.

SALTER, M. W. Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 557–67, jan. 2005.

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; MURBACH TELES ANDRADE, B. F.; MANGABEIRA DA SILVA, J. J.; ROGEZ, H. L. G.; CREVELIN, E. J.; BERALDO DE MORAES, L. A.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 12–18, mar. 2015.

SANTONI, G.; CARDINALI, C.; MORELLI, M. B.; SANTONI, M.; NABISSI, M.; AMANTINI, C. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. **Journal of Neuroinflammation**, v. 3, p. 1–10, feb. 2015.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, feb. 2010.

SATOR-KATZENSCHLAGER, S. Pain and neuroplasticity. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 25, n. 4, p. 699–706, jul. 2014.

SCHAEFER, L. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 51, p. 35237–35245, nov. 2014.

SCHAIBLE, H. G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 177, p. 3–28, jan. 2007.

SCHILDBERGER, A.; ROSSMANITH, E.; EICHHORN, T.; STRASSL, K.; WEBER, V. Cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. **Mediator of Inflammation**, v. 2013, n. 697972, p. 1–10, 2013.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–472, aug. 2014.

SENEDESE, J. M.; ALVES, J. M.; LIMA, I. M. D. S.; DE ANDRADE, E. A. P.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 3, jan. 2013.

SENEDESE, J. M.; RINALDI-NETO, F.; FURTADO, R. A.; NICOLLELA, H. D.; DE SOUZA, L. D. R.; RIBEIRO, A. B.; FERREIRA, L. S.; MAGALHÃES, G. M.; CARLOS, I. Z.; DA SILVA, J. J. M.; TAVARES, D. C.; KENUPP BASTOS, J. Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 331–337, dec. 2019.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, sep. 2004.

SÍMARO, G. V.; LEMOS, M.; DA SILVA, J. J.; CUNHA, W. R.; CARNEIRO, L. J.; AMBRÓSIO, S. R.; CUNHA, N. L.; ANDRADE, S. F.; ARRUDA, C.; BANDERÓ-FILHO, V.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A. In vivo study

of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin. **Natural Product Research**, v. X, n. X, p. 2018–2021, 2020.

SÍMARO, G. V.; LEMOS, M.; MANGABEIRA DA SILVA, J. J.; RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; SCHNEIDER, A. H.; WAGNER DE SOUZA WANDERLEY, C.; CARNEIRO, L. J.; MARIANO, R. L.; AMBRÓSIO, S. R.; FALONI DE ANDRADE, S.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; ANDRADE E SILVA, M. L.; BASTOS, J. K. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin and its major metabolite ent-hardwickiic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, n. October 2020, p. 113883, oct. 2021.

SMITH, L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology**, v.263, p. 7–10, aug. 1992.

SOKOLOVA, E. V.; KARETIN, Y.; DAVYDOVA, V. N.; BYANKINA, A. O.; KALITNIK, A. A.; BOGDANOVICH, L. N.; YERMAK, I. M. Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 104, n. 7, p. 1603–1609, jul. 2016.

SONG, M.; PHELPS, D. S. Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 1, p. L110–L117, jul. 2000.

SOUSA, J. P. B.; BRANCALION, A. P. S.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C. C.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A J. C.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653–9, mar. 2011.

SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. M.; FURTADO, N. A J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 215–220, feb. 2011.

SOUZA, A. B.; MOREIRA, M. R.; BORGES, C. H. G.; SIMÃO, M. R.; BASTOS, J. K.; DE SOUSA, J. P. B.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for analysis of (-)-copalic acid in copaíba oleoresin. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 3, p. 280–283, mar. 2013.

SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes - "the enemy within". **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 6, p. 441–55, jun. 2002.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (United Kingdom)**, v. 31, n. 2, p. 49–53, dec. 2013.

STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1003–8, aug. 2003.

STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 11845–6, set. 2001.

SUN, S.-C.; CHANG, J.-H.; JIN, J. Regulation of NF- κ B in Autoimmunity. **Trends Immunology**, v. 34, n. 6, p. 282–289, jun. 2013.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 19, p. 805–820, mar. 2010.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. v. 6, n. Kishimoto 1989, p. 1–16, set. 2014.

TANIKAWA, N.; OHMIYA, Y.; OHKUBO, H.; HASHIMOTO, K.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; ITO, S.; WATANABE, K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 291, n. 4, p. 884–889, mar. 2002.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Quantitative chemical analysis for the standardization of copaiba oil by high resolution gas chromatography. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–40, apr. 2004.

TONG, C.; MACDERMOTT, A. B. Synaptic GluN2A and GluN2B Containing NMDA Receptors within the Superficial Dorsal Horn Activated following Primary Afferent Stimulation. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 33, p. 10808–10820, aug. 2014.

TOREBJORK, H. E.; LUNDBERG, L. E. R.; LAMOTTE, R. H. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **Journal of Physiology**, v. 448, p. 765–80, mar. 1992.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, nov. 2014.

URBAN, M. O.; GEBHART, G. F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7687–92, jul. 1999.

VANDEUSEN, J. B.; SHAH, M. H.; BEKNELL, B.; BLASER, B. W.; FERKETICH, A. K.; NUOVO, G. J.; AHMER, B. M. M.; DURBIN, J.; CALIGIURI, M. A. STAT-1-

mediated repression of monocyte interleukin-10 gene expression in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 3, p. 623–630, mar. 2006.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 327–363, jul. 2001.

VAZQUEZ, E.; NAVARRO, M.; SALAZAR, Y.; CRESPO, G.; BRUGES, G.; OSORIO, C.; TORTORICI, V.; VANEGAS, H.; LÓPEZ, M. Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. **Inflammation Research**, v. 64, n. 5, p. 333–342, may. 2015.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. The *Copaifera* L. genus. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–86, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ANDRADE JUNIOR, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 123–126, jul. 2007.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, may. 2005.

VEIGA, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. 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**, v. 112, n. 2, p. 248–254, mar. 2007.

VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; SHARKEY, K. A.; BRUSSEE, V.; COMPTON, S. J.; GRADY, E. F.; CIRINO, G.; GERARD, N.; BASBAUM, A. I.; ANDRADE-GORDON, P.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. **Nature Medicine**, v. 7, n. 7, p. 821–826, jul. 2001.

VESTWEBER, D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 281–91, mar. 2000.

VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 70–82, nov. 2015.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some Quantitative Temporal Characteristics of Carrageenin-Induced Pleurisy in the Rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711–714, jul. 1973.

VOLPATO, A.; GROSSKOPF, R. K.; SANTOS, R. C.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R.

P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. Influence of rosemary, andiroba and copaiba essential oils on different stages of the biological cycle of the tick *Rhipicephalus microplus in vitro*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 244–250, feb. 2015.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bände der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v. 23, p. 175–266, 1896.

WALZ, A.; PEVERI, P.; ASCHAUER, H.; BAGGIOLINI, M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 149, n. 2, p. 755–761, 1987.

WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 8, p. 949–65, ago. 2003.

WANG, T.; WU, F.; JIN, Z.; ZHAI, Z.; WANG, Y.; TU, B.; YAN, W.; TANG, T. Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264 . 7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 177–183, dec. 2014.

WILLIS, W. D. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 2, p. 297–313, oct. 2007.

WINTER, C. A. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, dec. 1962.

WITTER, J.; SIMON, L. S. Chronic pain and fibromyalgia: the regulatory perspective. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 4, p. 541–546, aug. 2003.

WOZNIAK, K. M.; ROJAS, C.; WU, Y.; SLUSHER, B. S. The Role of Glutamate Signaling in Pain Processes and its Regulation by GCP II Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1323–1334, 2012.

ZHAN, R.; HE, W.; WANG, F.; YAO, Z.; TAN, J.; XU, R.; ZHOU, J.; WANG, Y.; LI, H.; WU, J.; LUO, G. Nitric oxide promotes epidermal stem cell migration via cGMP-Rho GTPase signalling. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, jul. 2016.

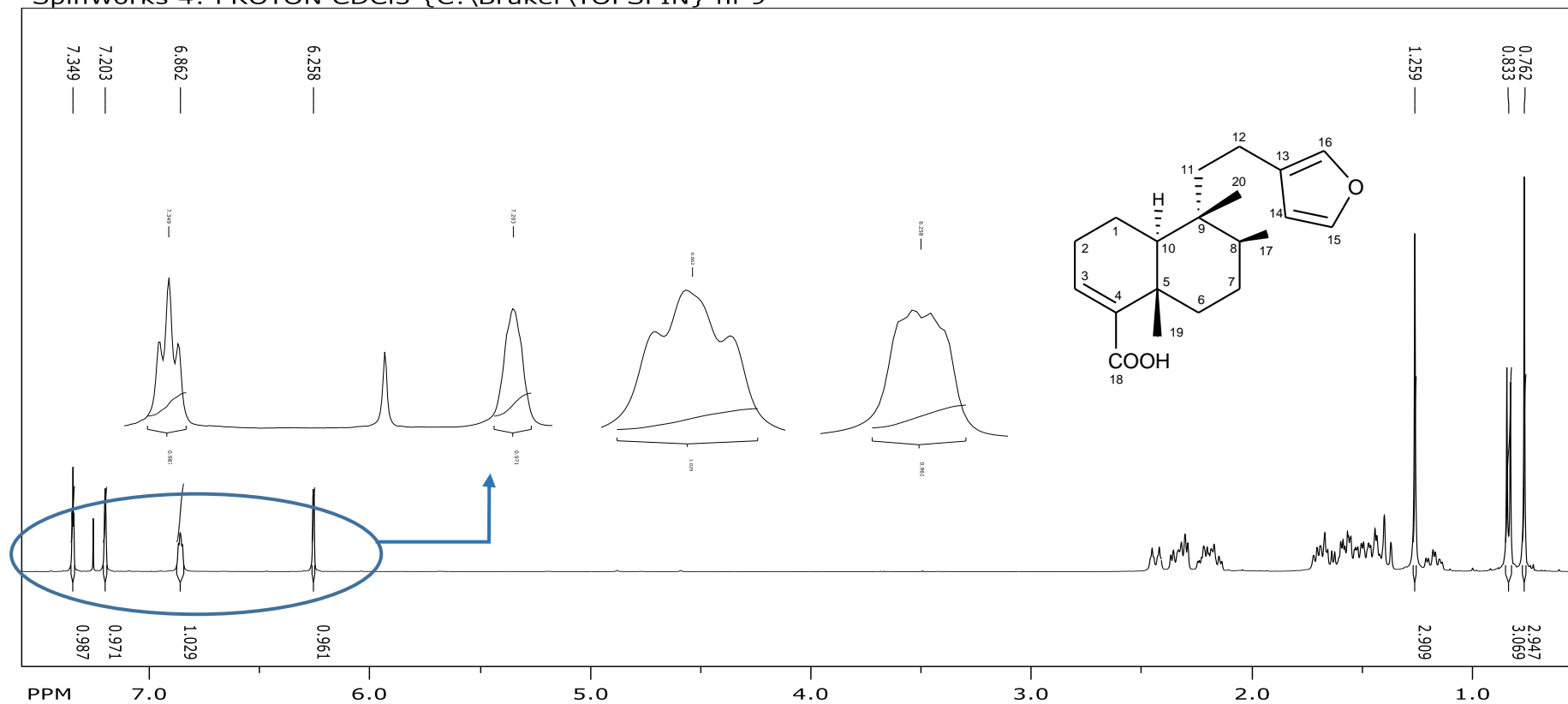
ZHANG, Q.; RAOOF, M.; CHEN, Y.; SUMI, Y.; SURSAL, T.; JUNGER, W.; BROHI, K.; ITAGAKI, K.; HAUSER, C. J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104–107, mar. 2010.

ZHANG, H.; SUN, S. C. NF-KB in inflammation and renal diseases. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–12, nov. 2015.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. **Journal of Cultural Heritage**, v. 1, n. 2, p. 121–127, feb. 2000.

APÊNDICES

SpinWorks 4: PROTON CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} nf 9

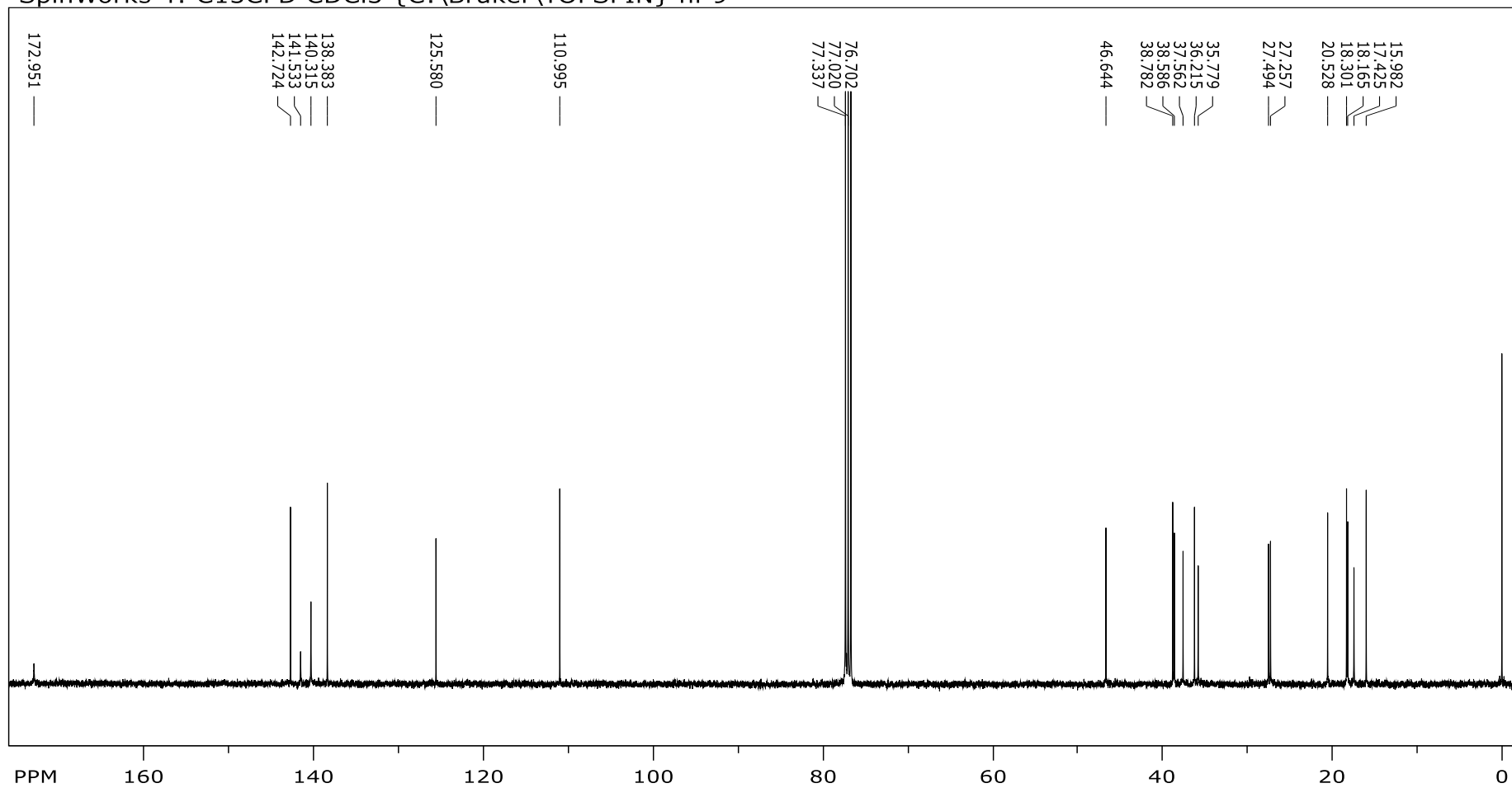


file: ...MN\hardwickiico - OCPub 3.12\1\fid expt: <zg30>
 transmitter freq.: 400.132471 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 8278.15 Hz = 20.6885 ppm = 0.126314 Hz/pt
 number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130009 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.300 GF: 0.0000

Apêndice 1. Espectro de RMN ^1H do ácido *ent*-hardwickiico ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$)

SpinWorks 4: C13CPD CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} nf 9



file: ...e\RMN\hplc201a - OCPub 3.12\15\fid expt: <zpgg30>
transmitter freq.: 100.622830 MHz
time domain size: 65536 points
width: 23980.82 Hz = 238.3238 ppm = 0.365918 Hz/pt
number of scans: 976

freq. of 0 ppm: 100.612770 MHz
processed size: 32768 complex points
LB: 1.000 GF: 0.0000

Apêndice 2. Espectro de RMN ^{13}C do ácido *ent*-hardwíckiico ($\text{CDCl}_3/100$ MHz).

ANEXO

Anexo 1 - Termo de autorização para ensaios farmacológicos *in vivo*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das atividades, citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleoresina de *Copaifera pubiflora* benth e dos seus compostos majoritários", registrada sob nº 16.1.788.60.8, sob a responsabilidade de Guilherme Venâncio Simaro e Jairo Kenupp Bastos, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP no dia 09/12/2016.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	12/12/2016 a 30/11/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	160
Peso/Idade	15 a 21g/ 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central do Campus USP RP

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2016.


Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP