



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR

ALINE DA SILVA BARBOSA

AValiação FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO ÁCIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA
INTERCALADA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

BELÉM – PARÁ
2017

ALINE DA SILVA BARBOSA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO ÁCIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA
INTERCALADA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luana Melo Diogo de Queiroz

BELÉM – PARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B238a Barbosa, Aline da Silva
 Avaliação farmacológica da fração ácida do óleo de copaíba intercalada em hidróxidos duplos lamelares /
 Aline da Silva Barbosa. - 2017.
 82 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular
 (PPGQM3), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
 Orientação: Profa. Dra. Luana Melo Diogo De Queiroz
1. Copaífera. 2. Óleo de copaíba. 3. HDLs. 4. Nocicepção. 5. Inflamação. I. De Queiroz, Luana Melo
 Diogo, *orient.* II. Título

CDD 615

ALINE DA SILVA BARBOSA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO ÁCIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA
INTERCALADA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luana Melo Diogo de Queiroz

Dissertação apresentada em: ___/___/___.



Prof. Dr^a. Luana Melo Diogo de Queiroz (UFPA) – Presidente



Prof. Dr. Rosivaldo, dos Santos Borges (UFPA) – Membro interno



Prof. Dr. Eneias de Andrade Fontes Júnior (UFPA) - Membro externo

BELÉM – PARÁ

2017

À minha mãe, Maria Eunice da Silva
Barbosa, que sempre foi o meu grande
apoio em toda a minha vida, e ao meu
noivo, Gustavo Resque, que sempre
esteve ao meu lado em todas as minhas
decisões.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus que me deu o dom da vida, pois sem Ele eu nada seria.

À minha família pelo apoio em toda a minha vida pessoal e profissional.

Ao meu noivo Gustavo Resque que sempre se fez presente em muitos momentos difíceis e sempre obtive seu apoio incondicional.

Ao programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular e à UFPA.

À professora Dra Luana Melo Diogo de Queiroz que me deu a oportunidade de realizar este trabalho, por ter sempre acreditado em mim, a qual agradeço muito pelas orientações e contribuições profissionais. Meus sinceros agradecimentos!

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Avaliação de Fármacos e Produtos Naturais, pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço aos laboratórios que auxiliaram na realização dos testes experimentais deste trabalho: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do comportamento (LAFICO), Laboratório de Hematologia e Laboratório de Ensaio *in vitro*, Imunologia, Estresse Oxidativo e Microbiologia.

“Fácil é sonhar todas as noites. Difícil é lutar por um sonho”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O óleo de copaíba é tradicionalmente usado na região Amazônica do Brasil para o tratamento da dor e inflamação. A fração ácida do óleo de copaíba (FAOC) é constituída por diterpenos e, dentre eles, o ácido copálico destaca-se como componente majoritário, sendo dotado de atividade anti-inflamatória *in vitro*. Além da pesquisa por novos princípios ativos, há também interesse em modelos de administração que venham otimizar a ação de fármacos. Para isso, uma alternativa é a liberação controlada de fármacos, que pode ser obtida através da intercalação destes em Hidróxidos duplos lamelares (HDLs). Nesse sentido, esta pesquisa objetivou avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da FAOC e da FAOC intercalada em HDL (FAOC-HDL) em modelos *in vivo* de nocicepção e inflamação. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos (4 a 6 semanas de idade, 25-35g de peso) divididos em grupos (n=6) e tratados por via oral (0,1 mL/10g), com controle negativo (veículo), HDL, FAOC, FAOC-HDL, e controle positivo, 1h, 24h ou 48 horas. Primeiramente foi determinada a dose efetiva mediana (DE₅₀) e em seguida foram realizados os modelos experimentais de contorção abdominal induzido por ácido acético, teste de formalina, edema de orelha induzido por óleo de cróton, o teste de edema de pata induzido por carragenina e, a peritonite induzida por carragenina. A DE₅₀ encontrada para a FAOC de 98 mg/kg e para a FAOC-HDL de 222,9 mg/kg, ambas as doses foram usadas nos tratamentos dos testes posteriores. Após 1h de tratamento a FAOC (98 mg/kg) e a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) inibiram significativamente o número de contorções abdominais respectivamente em: 49,99% (22,67 ± 1,56) e 56,99% (19,5 ± 2,69); o tempo de lambidas da pata no teste de formalina em 28,93% (113,6 ± 12,45) e 60,79% (62,67 ± 11,02) na segunda fase do teste; o desenvolvimento do edema de orelha em 25,59% (2,53 ± 0,21) e 47,65% (1,78 ± 0,20) e, desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina na 2ª e 3ª hora do teste em 39,72% (0,17 ± 0,03) e 36,04% (0,21 ± 0,03). A FAOC (98 mg/kg) e a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) também reduziram significativamente a migração dos leucócitos totais, respectivamente em 73,17% (1,95 ± 0,38), 75,69% (1,77 ± 0,28); de neutrófilos em 62,82 % (1,61 ± 0,31), 91,0% (0,39 ± 0,10) no teste de peritonite. Foi observado efeito significativo no tratamento com FAOC-HDL (222,9 mg/kg) após 24h de tratamento, ao inibir o número de contorções abdominais em 58,34% (20,0 ± 3,97); o tempo de lambidas da pata no teste de formalina em 33,97% (98,83 ± 13,64); o desenvolvimento do edema de orelha em 57,05% (2,47 ± 0,36) e, o desenvolvimento do edema de pata na 3ª hora do teste em 30,28%, (0,27 ± 0,02). Assim, os resultados obtidos mostram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da FAOC e, sustentação deste efeito pela intercalação da FAOC em HDL.

Palavras-chave: *Copaifera*, óleo de copaíba, HDLs, nocicepção, inflamação.

ABSTRACT

Copaiba oil is traditionally used in the Amazon region of Brazil for pharmacological purposes as pain and inflammation. The acidic fraction of copaiba oil (FAOC) consists of diterpenes and, among them, excels copalic acid as major component, being endowed with anti-inflammatory activity *in vitro*. In addition to the research for new active principles, there is also interest in management models that optimize the action of drugs. For this, an alternative is the controlled release of drugs, which can be obtained by the intercalation of these in Lamellar Double Hydroxides (HDLs). Thus, this study aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activity of the FAOC and FAOC intercalates in HDL (FAOC-HDL) *in vivo* models of nociception and inflammation. Male (*Mus musculus*) mice (4 to 6 weeks old, weight 25-35g) were divided into groups (n = 6) and treated orally (0.1mL/10g), with negative control (vehicle), HDL, FAOC, FAOC-HDL, and positive control, 1h, 24h and 48h before each test. First, was determined the median effective dose (DE50) and then the experimental models of acetic acid-induced abdominal contraction, formalin test, croton oil-induced ear edema, carrageenan-induced paw edema test and peritonitis induced by carrageenan. The ED 50 found was FAOC (98 mg/kg) and FAOC-HDL (222.9 mg/kg). After 1 h of treatment, FAOC (98 mg/kg) and FAOC-HDL (222.9 mg/kg) significantly inhibited the number of abdominal writhing respectively in 49.99% (22.67 ± 1.56) and 56.99% (19.5 ± 2.69), the paw licking time in the formalin test was 28.93% (113.6 ± 12.45) and 60.79% (62.67 ± 11.02) in the second phase of the test, development of ear edema in 25.59% (2.53 ± 0.21) and 47.65% (1.78 ± 0.20) and development of paw edema in the 2nd and 3rd hour of the test and the migration of total leukocytes by 73.17% (1.95 ± 0.38) and 75.69% (1.77 ± 0.28) and neutrophils in 62.82 (1.61 ± 0.31), 91.0% (0.39 ± 0.10) in the peritonitis. There was also a significant effect on treatment with FAOC-HDL (222.9 mg/kg) after 24 h of treatment, inhibiting the number of abdominal writhes in 58.34% (20.0 ± 3.97), lambda time of the paw in the formalin test 33.97% (98.83 ± 13.64), the development of ear edema in 57.05% (2.47 ± 0.36) and the development of paw edema in the 3rd hour of the test in 30.28%, (0.27 ± 0.02). Thus, the results obtained show antinociceptive and anti-inflammatory effect of the FAOC and, underpinning this effect by the controlled release of FAOC intercalates in HDL.

Keywords: Copalic acid, *Copaifera*, HDLs, nociception, inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Copaifera officinalis*.

Figura 2: Estrutura química do Ácido Copálico.

Figura 3: Cascata do ácido araquidônico: formação de eicosanoides.

Figura 4: Estrutura dos Hidróxidos duplos lamelares (HDLs).

Figura 5: Tratamentos e distribuição dos grupos experimentais para avaliação da atividade farmacológica *in vivo*.

Figura 6: Efeito do tratamento oral com diferentes doses da FAOC, na contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak (A). A linha representa a regressão linear calculada para os dados e R^2 o coeficiente de correlação (B).

Figura 7: Efeito do tratamento oral com diferentes doses da FAOC-HDL, na contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak (A). A linha representa a regressão linear calculada para os dados e R^2 o coeficiente de correlação (B).

Figura 8: Efeito sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%), do tratamento oral com: veículo (0,1mL/10g), HDL (222,9 mg/kg), FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste (n = 6/grupo). Os dados representam a média \pm E.P.M. **** $P < 0,0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak.

Figura 9: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Morfina (4 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste de formalina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguido de Holm-Sidak.

Figura 10: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste de dermatite de orelha. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguido de Holm-Sidak.

Figura 11: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste de edema de pata induzido por carragenina 1%. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. ANOVA de 2 vias seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Figura 12: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A), 24h (B) antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de leucócitos totais. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$, significativo em relação ao veículo (carragenina). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Figura 13: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A) e 24h (B), antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de neutrófilos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ significativo em relação ao veículo (carragenina). # $P < 0,0001$ significativo em relação ao veículo (salina). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Figura 14: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A) e 24h (B), antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de células mononucleares. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido α -amino-5- hidroxil-3- metilisoxazol-4-propiónico
COX	Ciclooxigenase
DE ₅₀	Dose efetiva mediana
EP ₂	Receptor de prostaglandina E ₂
FAOC	Fração ácida do óleo de copaíba
FAOC-HD	Fração ácida do óleo de copaíba intercalada em HDL
HDL	Hidróxidos duplos lamelares
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IP	Receptor de prostaciclina I ₂
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
mGluR	Receptor metabotrópico para o glutamato
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NRM	Núcleo magno da rafe
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAG	Matéria cinzenta periaquedutal
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PKC	Proteína quinase C
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVM	Medula rostroventromedial
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TPA	12-O-acetato de tetradecanoilforbol
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Copaifera</i>	19
2.2 Ácido copálico	21
2.3 Dor e nocicepção	23
2.3.1 Mecanismos envolvidos no sinal da dor	26
2.3.2 Dor como um sinal de inflamação	28
2.4 Inflamação	29
2.5 Tratamento farmacológico para a inflamação	34
2.6 Nanocarreadores (Argilas e Argilominerais)	35
2.7 Hidróxidos Duplos Lamelares e Nanocarreamento de fármacos	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAS E MÉTODOS	42
4.1 Óleo de copaíba	42
4.2 Fração ácida do óleo de copaíba (FAOC)	42
4.3 Fração ácida do óleo de copaíba intercalada em HDL (FAOC-HDL)	42
4.3 Animais	42
4.4 Tratamentos	43
4.5 Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE ₅₀)	45
4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva	45
4.6.1 Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético	45
4.6.2 Teste da formalina	45

4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	46
4.7.1 Dermatite induzida pelo óleo de cróton.....	46
4.7.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina.....	46
4.7.3 Peritonite induzida por carragenina.....	47
4.8 Fármacos, reagentes e soluções.....	47
4.9 Equipamentos e aparelhos	48
4.10 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE ₅₀).....	49
5.1.1 Fração ácida do óleo de copaíba.....	49
5.1.2 Fração ácida do óleo de copaíba, intercalada em nanocarreadores de Hidróxidos Duplos Lamelares.....	50
5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	51
5.2.1 Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.....	51
5.2.2 Teste da formalina.....	52
5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	53
5.3.1 Teste da dermatite induzida pelo óleo de cróton.....	53
5.3.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina.....	53
5.3.3 Teste da peritonite induzida por carragenina.....	55
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9 ANEXOS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um complexo mecanismo de defesa do organismo quando este sofre uma lesão ou infecção, estreitamente relacionado com o sistema imune. O sistema imune é constituído por células e fatores solúveis que medeiam o processo inflamatório a fim de eliminar o agente desencadeante e dar início ao processo de memória imunológica (BARTON, 2008). No processo inflamatório ocorre o aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação e adesão celular e coagulação. Essa rede de respostas é caracterizada pelos sinais clínicos de rubor (vermelhidão), calor, edema, dor e perda da função (MEDZHITOV, 2008; BASIL e LEVY, 2016).

A resposta inflamatória normal é um processo agudo, que sofre resolução após a remoção de um estímulo desencadeante. Entretanto, a inflamação pode se tornar prejudicial quando a resposta inflamatória normal progride para a inflamação crônica, e pode desencadear doenças como a artrite reumatóide (MEDZHITOV, 2008).

Para o tratamento de uma inflamação aguda, os medicamentos mais utilizados são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que têm propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, cuja ação farmacológica decorre da inibição da síntese de prostaglandinas, mediante a inativação das ciclooxigenases (COX) constitutiva (COX-1) e da induzível em processos inflamatórios (COX-2) (PARENTE e PERRETTI, 2003; HWANG et al., 2013).

No entanto, as ciclooxigenases atuam em atividades fisiológicas fundamentais, proporcionando homeostasia vascular, manutenção do fluxo sanguíneo renal e gastrointestinal, função renal, proliferação da mucosa intestinal, função plaquetária e anti-trombogênese (PARENTE e PERRETTI, 2003). Logo, ao inibir as ciclooxigenases, os AINEs podem desencadear reações adversas importantes, com implicações renal, gastrointestinal e cardiovascular (SIMMONS et al., 2000; HARIRFOROOSH et al, 2013).

Além do uso dos AINEs para o tratamento da inflamação, o uso de produtos naturais pela população é bastante significativo. Os produtos naturais são de grande importância como fonte de princípios ativos com propriedades farmacológicas, em especial as espécies vegetais (NEWMAN et al, 2012).

Várias são as espécies de interesse biológico encontradas na região amazônica, entre as quais se destacam as plantas do gênero *Copaifera*, das quais pode ser obtido um óleo

denominado “óleo de copaíba”, muito utilizado pela população local para o tratamento da inflamação e cicatrização (CASCON e GILBERT, 2000; MACIEL et al., 2002).

A obtenção do óleo de copaíba ocorre através de uma incisão, a cerca de um metro de altura do tronco da árvore e, além do consumo tradicional, este óleo vem sendo empregado também na indústria, para fins de fabricação de cosméticos (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; PIERI et al, 2009).

O óleo de copaíba é constituído de compostos químicos sesquiterpenos como óxido de β -cariofileno e β -bisabolene, e diterpenos como o ácido copálico, diversos estudos com óleo de copaíba e com frações purificadas deste óleo, sugerem que esses compostos possuem propriedades farmacológicas, tais como atividade antineoplásica e antimicrobiana em estudos *in vitro* e *in vivo* (GOMES et al, 2008; SOUZA et al, 2011b).

Dentre estes constituintes, o ácido copálico foi identificado em muitas espécies de *Copaifera* estudadas, e se tornou um padrão (marcador) de óleos de copaíba em estudos de caracterização química. Como foi observado nesses estudos de caracterização e avaliação farmacológicas dos óleos de copaíba, a atividade farmacológica da fração ácida diterpenica foi atribuída principalmente ao ácido copálico (VEIGA JÚNIOR et al, 2007; GOMES et al, 2010).

Assim como foi demonstrado em estudo onde a fração ácida, em que estão contidos os diterpenos, presentes em óleos de copaíbas, bem como em outras espécies demonstraram atividades anti-inflamatórias em modelos *in vitro* (LIU e NAIR, 2011).

Associada a busca por novos princípios ativos, existe uma crescente busca por formas de administração de fármacos. Dessa maneira, novas alternativas, como por exemplo, a liberação sustentada de drogas tem sido estudada, pois oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos (ERTEKIN et al., 2015).

O uso de nanocarreadores no encapsulamento de fármacos, têm se destacado nas últimas décadas como sistemas de liberação controlada de drogas (GUNDUZ et al., 2013; OBEROI et al., 2013). Entre suas vantagens destacam-se à possibilidade da redução da toxicidade de drogas, liberação sustentada, além de aumento da eficácia do medicamento e diminuição das quantidades terapêuticas necessárias (HO et al., 2012; MONDAL et al., 2016).

Para isso, é crescente o interesse da utilização de materiais nanoestruturados, como exemplo, hidróxidos duplos lamelares (HDL) que são materiais inorgânicos biodegradáveis

potencialmente usados como sistemas de liberação de fármacos que podem ser sintetizados em laboratório (AMBROGI et al., 2001; AMBROGI et al., 2003; LI et al., 2004; CAO et al., 2011; RIVES et al., 2013).

Desta forma, surgiu o interesse em avaliar os efeitos farmacológicos da fração ácida do óleo de copaíba, e sua ação em sistema de liberação controlada. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração ácida do óleo de copaíba e, comparar com o efeito da sua intercalação em nanocarreadores de HDL.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Copaifera*

No Brasil, a utilização das plantas medicinais para o tratamento das enfermidades, é relatada desde o início da colonização pela população indígena (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; PIERI et al., 2009). Na região Amazônica do Brasil, as plantas medicinais permanecem sendo de grande uso pela população até a atualidade, e podem ser encontradas para comercialização em feiras livres e mercados populares (MACIEL et al., 2002).

O conhecimento sobre plantas medicinais acumulados e transmitidos entre gerações contribui de forma relevante para a divulgação das ações terapêuticas das plantas medicinais, embora a maior parte não tenha ainda seus constituintes químicos elucidados (MACIEL et al., 2002).

Entre as plantas amplamente utilizadas na região amazônica estão as espécies do gênero *Copaifera*, que são comuns na América Latina e África Ocidental. No Brasil são encontradas nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; PIERI et al., 2009).

Essas plantas chegam a viver cerca de 400 anos, e atingem uma altura entre 25 e 40 metros (Figura 1), diâmetro entre 0,4 e 4 metros, possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002). O gênero *Copaifera* pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e sub-família Caesalpinioideae.



Figura 1: *Copaifera langsdorffii*

Fonte: PIERI et al., 2009

As espécies de copaíbas são encontradas também na Colômbia, Venezuela e San Salvador onde são popularmente conhecidas como copaibeiras ou “pau d’óleo”. Nas Guianas destaca-se a espécie *Copaifera guianensis* Desf. e na Argentina e no Paraguai a espécie *Copaifera langsdorfii* Desf (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

No Brasil muitas espécies desse gênero são encontradas, entre as que são mais abundantes estão: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Bth., *Copaifera langsdorfii* Desf., *Copaifera coriacea* Mart. e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke. A espécie *Copaifera langsdorfii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída por todo o território (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

Das árvores de *Copaifera*, é possível extrair o óleo-resina, denominado óleo de copaíba, provenientes dos canais esquizolizígeos secretores localizados em todas as partes da árvore (PIERI et al., 2009). Os óleos de copaíba já são utilizados na indústria de cosméticos na produção de sabonetes e xampus, entretanto são mais utilizadas na medicina tradicional para tratar doenças respiratórias e do trato urinário, úlceras de estômago, amigdalite, e doenças infecciosas (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

Dentre as suas aplicações na medicina tradicional, as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antineoplásica têm sido avaliadas em estudos com várias espécies de *Copaifera*, por exemplo: *C. reticulata* Ducke, *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. multijuga* Hayne, em que foram utilizados óleos das espécies em modelos *in vivo* (VEIGA JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2008; GOMES et al., 2010).

As características físico-químicas, bem como a sua constituição química, pode variar de acordo com a espécie e região em que se encontra, devido as características do solo e sazonalidade. Em estudos de caracterização química do óleo de copaíba são utilizados métodos das quais são usados cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (CASCON e GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2007).

Nesses estudos de caracterização química, observou-se que os óleos de copaíba são constituídos principalmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos, que pertencem ao grupo mais diversificado e comumente encontrado em produtos naturais, conhecidos como os terpenos ou terpenóides (CASCON e GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2007).

Os sesquiterpenos e diterpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal (CASCON e GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2007). Os sesquiterpenos são hidrocarbonetos formados por três unidades de isopreno (C_5H_8) e os diterpenos contém quatro unidades de isopreno na sua estrutura química. Estudos com óleo de copaíba sugerem que suas atividades biológicas são ocasionada por esses compostos (CASCON e GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2008; GOMES et al., 2010).

Entre os sesquiterpenos encontrados nos óleos de copaíba mais citados na literatura estão o β -cariofileno, α -copaeno, β -humuleno. Já os diterpenos mais citados presentes nesses óleos são os ácidos diterpênicos entre eles o ácido copálico, hardwíckiico e covalenico.

2.2 Ácido copálico

Estudos com fração ácida, fração onde estão presentes os constituintes ácidos, dos óleos de copaíba demonstram que nessa fração estão presentes os ácidos diterpênicos, sendo o ácido copálico o majoritário (GOMES et al., 2008; GOMES et al., 2010).

O ácido copálico (Figura 2) é um diterpeno de esqueleto do tipo labdano. Os diterpenos possuem 20 carbonos na sua estrutura e, na literatura já foram descritas atividades como: antimicrobiana (SOUZA et al., 2011a), antiparasitária (SARTORELLI et al., 2010), anti-inflamatória (LIU e NAIR, 2011) e antioxidante (GONZALEZ-BURGOS et al., 2012).

O Ácido copálico foi descrito pela primeira vez por Nakano e Djerassi, (1961) e estudos mostram que ele é encontrado em muitas óleo-resinas de várias espécies de *Copaifera* (VEIGA JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2010; SOUZA et al., 2011a), sendo assim um marcador de óleo de copaíba. Além da presença em espécies de *Copaifera*, o Ácido copálico já foi identificado e isolado de outras espécies de plantas tais como *Aristolochia sp* (SARTORELLI et al., 2010) e *Curcuma mangga* (LIU e NAIR, 2011), por exemplo.

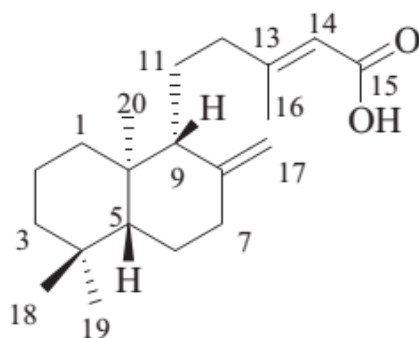


Figura 2: Estrutura química do ácido copálico

Fonte: Lama et al., 2014

Em um estudo *in vitro*, com o ácido copálico obtido do óleo de *Copaifera langsdorffii* avaliou-se a sua ação contra bactérias *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* e *Lactobacillus casei*, responsáveis pela carie dentária e, foi observado que o ácido copálico (2 – 6 µg/mL) inibiu o crescimento dessas bactérias (SOUZA et al., 2011a)

Em outra pesquisa realizada *in vitro*, em que o ácido copálico foi obtido a partir do óleo de *Copaifera langsdorffii*, relata que o ácido copálico nas concentrações de 6,2 – 50 µg/mL inibiu o crescimento de bactérias causadoras de doenças periodontais (SOUZA et al., 2011b).

Em estudo *in vitro*, com o ácido copálico isolado do óleo bruto de copaíba, foi avaliada sua ação contra uma proteína marcadora de câncer (Hsp27), onde o mesmo em uma concentração de 3,5 µg/mL mostrou uma atividade inibitória de 38% desta proteína, contribuindo para a atividade anticancerígena do óleo de copaíba (LAMA et al., 2014).

O ácido copálico oriundo de óleo-resina de copaíba inibiu as formas epimastigota e tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* em estudo *in vitro*, sugerindo que o ácido copálico na dose de 500 µM possui atividade anti-parasitária frente ao protozoário causador da doença de Chagas (IZUMI et al, 2012).

Na pesquisa com o ácido copálico obtido do extrato da planta *Curcuma mangga*, foi demonstrado que o ácido copálico a 25 µg/mL inibiu as enzimas COX-1 e COX-2 em 21% e 39% respectivamente, sugerindo que o mesmo possui uma atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro* (LIU e NAIR, 2011).

Em estudo *in vitro* observou-se uma atividade anti-inflamatória da fração purificada do óleo de copaíba da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf., pois houve uma inibição de secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNFα, nesta pesquisa o ácido copálico foi

identificado, sendo o majoritário, na fração purificada do óleo de copaíba (GELMINI et al., 2013).

O ácido copálico foi identificado no óleo de *Copaifera multijuga* Hayne em estudo *in vivo*, de avaliação anti-inflamatória e antinociceptiva das frações metanólica, hexânica e clorofórmica do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne. O ácido copálico foi identificado na fração metanólica (fração ácida), e os pesquisadores observaram que esta fração na dose de 150 mg/kg, bem como as outras frações mostraram ação anti-inflamatória e antinociceptiva (GOMES et al., 2010).

2.3 Dor e nocicepção

A dor pode ser caracterizada como uma experiência singular que o ser humano sente, influenciada por diversos fatores como emoção, cognição, memória, além do próprio meio social. Estas experiências são ocasionadas por sensores neuroanatômicos, vias específicas que permitem a sua detecção e o seu estímulo (ALMEIDA et al., 2004; FARQUHAR-SMITH, 2008).

A associação Internacional para o estudo da dor (IASP) define a dor como sendo uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão (ALMEIDA et al., 2004).

A dor pode ser classificada como aguda ou crônica de acordo com o seu tempo de duração. A dor aguda caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, causada por um estímulo nociceptivo que alerta o indivíduo a uma lesão nos tecidos, (BASBAUM et al., 2009). A dor crônica, por outro lado, persiste por um período prolongado, ela está associada a processos patológicos crônicos, causando sofrimento (ALMEIDA et al., 2004).

A dor crônica intensa pode ser denominada como dor neuropática. Esta é ocasionada por qualquer tipo de alteração do sistema nervoso somatossensorial, que altera a sua estrutura e função de modo que a dor ocorre espontaneamente (COSTIGAN et al., 2009).

O componente fisiológico da dor é a nocicepção, esta última refere-se aos sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC) resultante da ativação dos receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores, por estímulos aversivos térmico, químico ou mecânico (JULIUS e BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009; VARDEH et al., 2016).

A nocicepção é mediada por fibras aferentes primárias dos nervos periféricos, que conduzem o estímulo através das conexões sinápticas das células nervosas transmissoras, do local estimulado até o cérebro (COSTIGAN e WOOLF, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A nocicepção consiste em traduzir, transmitir e modular o sinal gerado através das vias nociceptivas ao SNC, através da via de três neurônios. Os neurônios de primeira ordem, originados na periferia, se projetam até a medula espinhal. Em seguida os neurônios de segunda ordem, que ascendem da medula espinhal até o neurônio de terceira ordem, que se projeta até o córtex cerebral (COSTIGAN e WOOLF, 2000; WOOLF e MA, 2007; BASBAUM et al, 2009).

Os nociceptores correspondem às terminações nervosas livres e representam a parte mais distal dos neurônios aferentes de primeira ordem. Estes consistem em fibras nervosas que podem ser mielinizadas A δ , A β e fibras C não mielinizadas que conduzem os impulsos nervosos em diferentes velocidades (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004; BASBAUM et al, 2009).

As fibras A δ são menores em diâmetro e estimulam a dor rápida, aguda e pontual, se diferem das fibras A β que possuem um diâmetro maior e respondem a estímulos inócuos. As fibras C, no entanto, são responsáveis pela condução lenta do impulso doloroso (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004).

As fibras A δ medeiam a primeira dor, representada pela dor aguda, passageira conduzida a uma velocidade de (5–20 m/s) que aparece logo após a lesão tecidual. Enquanto que as fibras C medeiam a segunda dor, uma dor mais latente e difusa, que se propaga por mais tempo a uma velocidade de (0.5–2.0 m/s) (ALMEIDA et al., 2004; FARQUHAR-SMITH, 2008).

As fibras A δ 1 corresponde a fibras de alto limiar para receptores mecânicos que respondem primariamente à estímulos mecânicos de alta intensidade e responde fracamente a estímulos térmicos ou químicos. No entanto as fibras A δ 2 apresentam receptores para estímulos mecânicos e térmicos sendo sensíveis a capsaicina a temperatura de aproximadamente 43 °C e alguns receptores de frio intenso (-15 °C) (ALMEIDA et al., 2004).

As fibras do tipo C apresentam receptores termossensíveis reagindo ao calor e frio, possui baixo limiar a receptores mecânicos, no entanto muitas fibras C possuem receptores de alto limiar respondendo igualmente a estímulos térmicos e mecânicos, ou são sensíveis a

estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e por esta razão são denominadas polimodais (ALMEIDA et al., 2004).

As respostas dos nociceptores periféricos estimulados ocorre por despolarização destes, o que desencadeia potenciais de ação, dependentes de canais iônicos dependentes de voltagem e também por receptor de potencial transitório (TRP) como o receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) ou capsaicina, que produzem dor ardente (FARQUHAR-SMITH, 2008; BASBAUM et al., 2009; WHITE et al., 2010).

Após a percepção do estímulo pelos receptores, ocorre uma despolarização e geração de um potencial de ação por toda a fibra (COSTIGAN et al., 2009). Os impulsos nervosos se conectam por sinapses a outros neurônios, decorrem em uma complexa rede neural que começa da espinha, ascende até o tálamo, para as áreas sensoriais do córtex onde supõe-se a percepção dor (WOOLF e SATER 2000; WOOLF et al., 2010).

Esta informação ascendente também estimula os neurônios das vias de projeções da medula rostroventromedial (RVM) e da substância cinzenta periaquedutal (PAG) que envolvem os sistemas descendente de feedback que regulam a saída a partir da medula espinhal (FARQUHAR-SMITH, 2008; BASBAUM et al., 2009; BUSHNELL et al., 2013).

As vias de projeção envolvem opióides endógenos, que se ligam nas regiões da via descendente nos receptores opióides que são expressos no corno dorsal da medula espinhal, incluindo RVM e PAG e nas regiões do córtex exercendo ações analgésicas potentes em ambas as transmissão e percepção da dor (BUSHNELL et al., 2013).

Os receptores opióides também são expressos em estruturas límbicas, mesencéfalicas e corticais. A ativação de receptores opióides nestes locais inibe diretamente os neurônios, que por sua vez inibem a transmissão da dor na medula espinhal. Atualmente são três os principais receptores opióides μ , κ e δ , localizados no sistema nervoso, os principais efeitos analgésicos dos medicamentos da classe dos opióides são mediados por esses receptores (AI-HASANI e BRUCHAS, 2011).

2.3.1 Mecanismos envolvidos no sinal da dor

A propagação da dor será iniciada após detecção do estímulo nocivo pelos receptores nocivos: os nociceptores que são amplamente encontrados em várias regiões do corpo (FARQUHAR-SMITH, 2008). Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A δ e C, estes medeiam a primeira e segunda dor

respectivamente (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004; FARQUHAR-SMITH, 2008).

Após a estimulação dos nociceptores aferentes primários, ocorrerá a transmissão das informações nocivas para os neurônios de projeção dentro do corno dorsal da medula espinal. Um subconjunto destes neurônios de projeção transmite a informação para o córtex somatossensorial através do tálamo, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Há outros neurônios de projeção que envolve os córtices cingulados e insular através de conexões no tronco cerebral (núcleo parabraquial) e a amígdala, contribuindo para o componente afetivo da experiência da dor (BASBAUM et al, 2009).

Os terminais centrais das fibras aferentes terminam no corno dorsal da medula espinal, que são formadas por seis lâminas que respondem a estímulos nociceptivos inibitórios e excitatórios, além dos estímulos mecânico e térmicos que se conectam com as fibras A δ , A β e C (ALMEIDA et al., 2004; D'MELLO e DICKENSON, 2008). As fibras nociceptivas A δ projetam-se para as lâminas I e V e as fibras nociceptivas C para as lâminas I e II, entretanto as fibras aferentes A β que respondem a estímulos inócuos atingem lâminas mais profundas (III – VI) (ALMEIDA et al., 2004; D'MELLO e DICKENSON, 2008; BASBAUM et al, 2009).

Após uma intensa estimulação ou uma lesão persistente, os nociceptores ativados A δ e C lançam uma variedade de neurotransmissores, incluindo substância P e glutamato (BASBAUM et al, 2009; WANG et al., 2009).

A substância P é um neuropeptídeo que é interligado em nociceptores aferentes primários levando estes a responder a estímulos nódico, responsável pela despolarização prolongada lenta dos neurônios através do *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) levando a estado de dor persistente (D'MELLO e DICKENSON, 2008; FARQUHAR-SMITH, 2008).

O glutamato é um aminoácido neurotransmissor essencial para a sinalização de dor em todos os níveis anatômicos, ele é um neurotransmissor excitatório, que exerce seu efeito nos receptores dos neurônios espinhais pós-sinápticos, levando a despolarização da membrana via três subclasses de receptores: ácido α -amino-5- hidróxi-3-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), NMDA e os receptores da família do receptor metabotrópico para o glutamato (mGluR) (D'MELLO e DICKENSON, 2008).

Nas vias ascendentes ocorre a interação de neurônios de primeira ordem com os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, onde se observa feixes de interação monossinápticas e polissinápticas (ALMEIDA et al., 2004).

Os feixes ascendentes possuem dois sistemas filogenéticos diferentes. O primeiro atravessa a região média do tronco cerebral, e é formado pelos feixes paleospinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquio-amigdalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico e espinohipotalâmico. O segundo ocupa a região lateral do tronco cerebral e consistem nos feixes neoespinotalâmico, espinocervical e feixe pós-sináptica do corno dorsal (ALMEIDA et al., 2004).

Além das vias ascendentes, também ocorrem as vias descendentes que são originadas no tronco encefálico, no hipotálamo, no córtex e no tálamo, que são interligados com fibras que partem de sistemas corticais e diencefálicos em direção à PAG, áreas do bulbo rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NRM) e as estruturas adjacentes da RVM, que exercem um papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal (MILLAN, 2002; MASON, 2005; D'MELLO e DICKENSON, 2008).

Os mecanismos das vias descendentes modulam as respostas nociceptivas ao exercer suas ações em neurônios primários aferentes, nos neurônios intrínsecos do corno dorsal, através da inibição dos neurônios excitatórios do corno dorsal superficial, mediada por uma conexão pós-sináptica que ocorre a partir da PAG sobre a atividade das fibras C impedindo a transmissão da informação para o corno dorsal profundo (HEINRICHERA et al., 2009).

Os mecanismos das vias descendentes incluem as fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, estas fibras descendentes suprimem a transmissão da dor nos neurônios nociceptivos da medula espinhal presumivelmente por neurônios sensoriais aferentes hiperpolarizante usando opióides endógenos, ou serotonina e norepinefrina como principais mediadores inibitórios (MARKS et al., 2009).

2.3.2 Dor como um sinal de inflamação

A dor tem um papel fisiológico importante, desempenhando um sinal de alerta para a percepção de algo que esteja ameaçando a integridade física do organismo (ALMEIDA et al., 2004).

A dor inflamatória desenvolve-se quando ocorre um aumento da sensibilidade dos nociceptores por um trauma, infecção, respostas imunes inadequadas, tumores, entre outros, sendo um sinal de alerta importante que ajuda a evitar danos aos tecidos (WOOLF, 2010).

No processo inflamatório ocorre a liberação dos mediadores químicos, estes podem atuar diretamente com os seus receptores cognatos encontrados em fibras aferentes primárias, contribuindo para excitação dos neurônios. Além disso, alguns destes agentes inflamatórios também ativam os canais iônicos (receptores ionotrópicos) encontrados nesses neurônios ou afetam a sensibilidade e a expressão destes. Esses receptores são componentes importantes do mecanismo pelo qual os agentes inflamatórios excitam as fibras aferentes primárias para resultar em condições de dor periférica (WHITE et al., 2010).

Dentre os mediadores inflamatórios cujos terminais periféricos de nociceptores expressam receptores estão o IL-1 β , TNF- α , quimiocinas, tais como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), prostaglandinas PGE₂ e PGI₂, bradicininas, fatores de crescimento do nervo, purinas, aminas, íons, e muitos outros, que acabam aumentando a sensibilidade dos terminais periféricos de nociceptores no tecido inflamado, denominado sensibilização periféricas, e contribui para a hipersensibilidade, dor inflamatória ou hiperalgesia primária (BASBAUM et al., 2009; WHITE et al., 2010; CHEN et al., 2013).

Após a estimulação periférica, o segundo mecanismo de hipersensibilidade a dor é a denominada sensibilização central que ocorre através do estímulo de liberação de neurotransmissores como o glutamato e substância P que a partir dos nociceptores terminais centrais aumentam a liberação de PGE₂, IL-1 β e TNF- α (CHEN et al., 2013).

Os processos subjacentes da sensibilização central refletem a plasticidade dos receptores nociceptivos que são invocados pela lesão. Eles são geralmente reversíveis dentro de horas a dias, seguindo respostas adequadas (por exemplo, em dor pós-operatória) (CHEN et al., 2013). Em casos de doenças com inflamação crônica, pode ocorrer modificação persistente da arquitetura dos nociceptores, que podem ocasionar mudanças de longa duração na sua capacidade de resposta, que contribuem para a ocorrência da dor crônica (COSTIGAN et al., 2009; CHEN et al., 2013).

2.4 Inflamação

A inflamação é considerada uma resposta adaptativa do organismo, frente a uma invasão por microrganismos causadores de doenças (patógenos), ou também pode ser observada quando ocorre um tipo de lesão tecidual química ou física (MEDZHITOV, 2008; WILTING et al., 2009; FULLERTON e GILROY, 2016).

A resposta inflamatória pode ser aguda, que é uma resposta natural do organismo e ocorre imediatamente após o dano tecidual, servindo como um mecanismo essencial para promover a cura da infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008; BASIL e LEVY, 2016).

No entanto se a resposta inflamatória persistir, esta é classificada como uma inflamação crônica, que é associada com o mau funcionamento do tecido, isto é, com o desequilíbrio homeostático de um dos vários sistemas fisiológicos que não estão diretamente relacionadas funcionalmente a defesa do hospedeiro ou reparação do tecido (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação possui cinco sinais clínicos, denominados sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão), edema (inchaço), calor, dor e perda da função. Esses sinais são manifestações decorrentes de um complexo mecanismo bioquímico ocasionado pelos mediadores inflamatórios a fim de manter a homeostase (BASIL e LEVY, 2016; STEWART e COOKSON, 2016).

A resposta inflamatória é iniciada pelos indutores de inflamação como o trauma, alterações tissulares e infecções. Eles ativam os mediadores especializados, que em seguida induzem a produção de conjuntos específicos de mediadores. Os mediadores, por sua vez, alteram os estados funcionais de tecidos e órgãos em uma maneira que lhes permite adaptarem-se às condições indicadas pelo determinado indutor de inflamação, formando complexas redes reguladoras (NATHAN, 2002; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios, entre eles o óxido nítrico, prostaglandinas e histamina, são responsáveis pela vasodilatação de artérias e arteríolas, o que resulta no aumento do fluxo sanguíneo. Em seguida ocorre a redução desse fluxo e aumento da permeabilidade vascular, o que favorece a migração de leucócitos e proteínas para o local da lesão (CUZZOCREA et al., 2004; MARTELL et al., 2010).

O exsudato inflamatório ocorre devido aos efeitos dos mediadores inflamatórios no local, que aumentam a permeabilidade vascular após ativação do endotélio dos vasos sanguíneos, e permitem a transmigração dos leucócitos, que passam para o tecido inflamado através de um processo que se apresenta em seis eventos: marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese (transmigração através do endotélio) e quimiotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático) (CONE, 2001, LEY et al., 2007).

A migração dos leucócitos, tais como os neutrófilos para o local da inflamação ocorrem através da interação destes com as células endoteliais. Este processo é ativado por mediadores pró-inflamatórios como interleucina (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Estes agem

sinergicamente aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais com receptores em leucócitos. Desta forma promovem o rolamento, adesão e transmigração extravascular (CONE, 2001; POBER e SESSA, 2007).

Ao chegarem ao local de ação, os neutrófilos tornam-se ativados por contato direto com agentes patogênicos ou por ações de citocinas segregadas por células do tecido residente. Uma vez ativados, eles liberam seus conteúdos tóxicos dos grânulos sobre os agentes invasores, a fim de tentar combatê-los. Os conteúdos tóxicos podem ser espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estes efetores são altamente potentes e podem causar danos ao hospedeiro, pois não sabem diferenciar as suas células e o agente agressor (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores são formados e liberados, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. Estes, em seguida, promovem os eventos celulares e vasculares. Assim as células que são restritas aos vasos sanguíneos ganham acesso ao local da infecção ou lesão através das vênulas pós-capilares, formando o edema (MEDZHITOV, 2008).

A origem destes mediadores pode ser plasmática ou celular. Os sistemas complemento (proteínas C3a e C5a) e de coagulação, o fibrinolítico e as cininas são mediadores plasmáticos e necessitam ser ativados para promover os seus efeitos biológicos (MEDZHITOV, 2008; ROCK e KONO, 2008, BASIL e LEVY, 2016).

Entre os mediadores de origem celular estão histamina, serotonina, fator de ativação plaquetária (PAF), citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, metabolitos do ácido araquidônico e os radicais livres derivados do oxigênio, que podem ser pré-formados ou sintetizados nas células ativadas, após um estímulo (NATHAN, 2002; MONTUSHI, 2007; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores plasmáticos, como o fator de Hageman (fator XII da cascata de coagulação), causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. As proteínas do sistema complemento promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos e induzem a degranulação de mastócitos, afetando a vasculatura (MEDZHITOV, 2008). Estes mediadores são pré-formadas e circulam como precursores inativos no plasma (ROCK e KONO, 2008). A concentração no plasma destes mediadores pode aumentar marcadamente conforme o aumento da secreção dos precursores pelos hepatócitos durante a resposta de fase aguda (MEDZHITOV, 2008; ROBINSON et al., 2016).

Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos especializados (particularmente nos macrófagos e mastócitos residentes no tecido) ou pelas células presentes nos tecidos locais. Eles possuem efeitos na vasodilatação e permeabilidade vascular, são responsáveis pela hiperalgesia, e são indutores da febre (ZHANG e AN, 2007; MEDZHITOV, 2008).

A histamina é uma amina básica e tem participação importante em fenômenos inflamatórios. Ela é liberada através da desgranulação de mastócitos, basófilos e plaquetas por ação de mediadores inflamatórios como o fator de crescimento neural (NGF). É segregado quando os componentes do complemento C3a e C5a interagem com receptores de membrana específicos ou quando o antígeno interage com imunoglobulina E (IgE) fixada em células (WHITE et al, 2010). Isto induz um aumento da vasodilatação e da permeabilidade vascular (MEDZHITOV, 2008). No organismo, a histamina se liga a quatro classes de receptores, H₁, H₂, H₃ e H₄, desempenhando um papel importante em doenças alérgicas e autoimunes (RABER, 2007; WHITE et al, 2010).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é encontrada principalmente nas células gastrointestinais, nas plaquetas do sangue e do SNC (BERGER et al., 2009). Na inflamação local (intestinal) ou periférica, a 5-HT é liberada pelas células enterocromafins ou pelas plaquetas, aumentando o processo inflamatório ao promover o recrutamento de mastócito, eosinófilos, células dendríticas e neutrófilos na inflamação aguda. Participam também no processo de vasodilatação e permeabilidade vascular (BOEHME et al., 2004; MEDZHITOV, 2008, SHAJIB e KHAN, 2014).

As citocinas são produzidas por várias células, principalmente por células T (Th) e por macrófagos, elas são os efetores da resposta inflamatória, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucinas como IL-1, IL-6, IL-8 (ZHANG e AN, 2007). As citocinas têm uma variedade de efeitos, inserindo expressão da molécula de adesão, quimiotaxia e ativação de outras vias inflamatórias, incluindo a ativação do endotélio e por sequente migração de leucócitos e indução da resposta de fase aguda (POBER e SESSA, 2007; BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2008).

O ácido araquidônico é o precursor de eicosanoides (substâncias geradas localmente), que exercem seus efeitos também no local. Os mediadores eicosanoides compreendem as prostaglandinas, os tromboxanos, os leucotrienos e produtos derivados de isoenzimas localizadas no citocromo P-450 (SIMMONS et al., 2004). As prostaglandinas PGE₂ e a PGI₂ regulam o fluxo sanguíneo, enquanto que os leucotrienos LTC₄ e LTD₄ regulam a

permeabilidade vascular, além disso, os neutrófilos transmigram para gradientes quimiotáticos de leucotrieno B₄ (LTB₄) (BASIL e LEVY, 2016).

A cascata do ácido araquidônico (Figura 4) acontece em resposta a um estímulo lesivo, que estimula citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 a ativar a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) presente nos leucócitos e plaquetas. Esta por sua vez degrada os fosfolípidos da membrana resultando no ácido araquidônico. (FUNK, 2001). Este último sofre oxidação enzimática por lipoxigenase, que forma os leucotrienos e lipoxinas e por ciclooxigenase que forma prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (FUNK, 2001; MEDZHITOV, 2008).

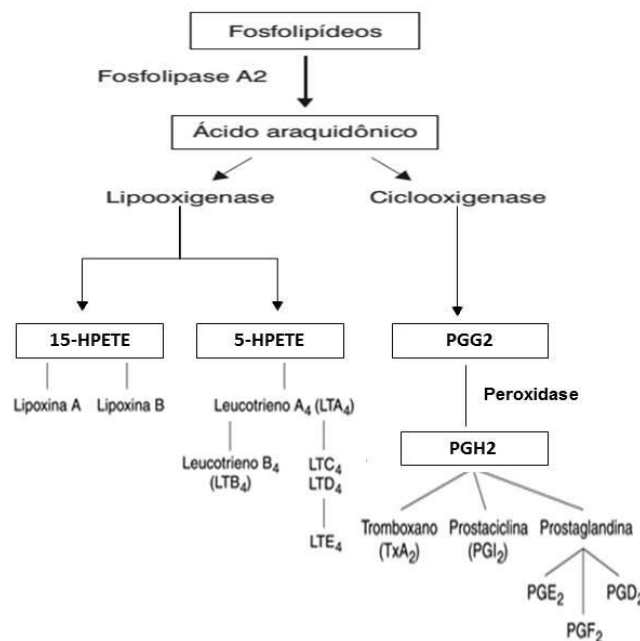


Figura 3: Cascata do ácido araquidônico: formação de eicosanoides.

Fonte: Adaptado de HILÁRIO, 2006.

A síntese das prostaglandinas inicia-se com a atividade das ciclooxigenases, que oxidam o ácido graxo precursor, formando o endoperóxido cíclico álcool (PGG₂). Em seguida, a peroxidase converte o PGG₂ em endoperóxido-hidropéroxido cíclico (PGH₂) e então essas prostaglandinas serão transformadas em prostaciclina, tromboxano A₂ e em prostaglandinas PGE₂, PGF₂ e PGD₂ (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

As prostaglandinas PGE₂ e PGI₂ (prostaciclina) estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação, e hipersensibilidade da dor (hiperalgesia), modulando múltiplos locais nas vias nociceptivas. Promovendo também a elevação da temperatura corpórea ao ativar os canais de TRPV1 (MEDZHITOV, 2008; CHEN et al,

2013). No trato gastrointestinal a PGE₂ e PGI₂ são citoprotetoras da mucosa gástrica, pois diminui a secreção gástrica, aumenta o fluxo sanguíneo local, e na superfície da camada da mucosa gástrica (PARENTE e PERRETTI, 2003).

Os leucotrienos são potentes mediadores pró-inflamatórios. Também são sintetizados a partir do ácido araquidônico pelas enzimas 5-lipoxigenases, estimulam diretamente e indiretamente proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (MONTUSHI et al., 2007). O principal leucotrieno envolvido na resposta inflamatória aguda é o LTB₄, sendo um importante agente quimiotático tanto para neutrófilos quanto para macrófagos. A elevação de LTB₄ tem relações com várias doenças inflamatórias tais como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e artrite (NATHAN, 2002).

2.5 Tratamento farmacológico para a inflamação

Os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos que combatem a inflamação e possuem muitas aplicações entre as quais no tratamento da dor aguda, e alívio da dor associada à condição crônica como osteoartrite e artrite reumatoide (HARIRFOROOSH et al, 2013). Desta forma, os AINEs estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo (SOSTRES, et al, 2010).

Estes fármacos agem pela inibição da ciclooxigenase (COX), que é responsável pela transformação do ácido araquidônico em prostaglandina (HARIRFOROOSH et al, 2013). Existem dois subtipos de ciclooxigenases, a COX-1 que catalisa a síntese das prostaglandinas constitutivas e a COX-2 que é ativada nas células inflamatórias pelas citocinas inflamatórias primárias, IL-1 e o TNF- α (SIMMONS et al., 2000; PARENTE e PERRETTI, 2003).

A COX-2 possui um papel significativo nas inflamações, principalmente na hiperalgesia, enquanto que a COX-1 é expressa em vários órgãos, sendo importante mediador das funções renal, reprodutiva e nervosa, contribuindo também para a citoproteção da mucosa digestória e para o controle da hemostasia sanguínea (SIMMONS et al., 2000; PARENTE e PERRETTI, 2003, CHEN et al, 2013).

Além da atividade anti-inflamatória, os AINEs também possuem ação analgésica e antipirética (HARIRFOROOSH et al, 2013; KAWAHARA et al, 2015). O efeito analgésico, associado à inflamação, também se deve há redução de prostaglandinas, bem como de bradicinina, que sensibilizam os nociceptores (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Já seu efeito antipirético está relacionado com a inibição das prostaglandinas no hipotálamo, que ocorre durante um processo infeccioso, através da liberação de IL-1. Esta IL-1 estimula a

produção de prostaglandinas do tipo E no hipotálamo, que por sua vez induzem a elevação do ponto de ajuste da temperatura (SIMMONS et al., 2000).

Os AINEs são as drogas mais largamente prescritas e utilizadas desde que o ácido acetilsalicílico, foi patenteado como aspirina no início do século XX (SIMMONS et al., 2000). Nas décadas de 60 e 70 foram lançados muitos anti-inflamatórios no mercado entre eles o ibuprofeno, a indometacina e o diclofenaco (SIMMONS et al, 2000; CURIEL e KATZ, 2013).

Esses AINEs convencionais, no entanto, além da ação terapêutica, exercem efeitos colaterais indesejados, sobretudo no trato gastrointestinal e nos rins. Podem ocasionar também aumento de problemas cardiovasculares (SIMMONS et al, 2000; CURIEL e KATZ, 2013). Sabe-se que a maioria dos efeitos indesejados dos AINEs devem-se a inibição da COX e, conseqüentemente, das suas funções biológicas (GAJRAJ, 2003; JONES et al, 2008).

Entre os medicamentos que também são usados para tratar a inflamação estão os chamados anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), glicocorticoides ou corticosteroides, que são usados em varias especialidades médicas como imunossupressor e em dermatologia (PEREIRA et al., 2007).

Os glicocorticoides agem na inflamação através da diminuição de moléculas pró-inflamatórias como interleucinas, fatores de adesão, fatores de crescimento e proteases (PAINE e ADCOCK, 2000; TRACEY 2002). No aumento das proteínas anti-inflamatórias anexinas 1 e 2 com subsequente inibição da fosfolipase A₂, o que reduz a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelo ácido araquidônico e também na inibição da COX 2 (MOORE e HOULT, 1980; WALNNER et al., 1986; SIMON, 1999).

2.6 Nanocarreadores (Argilas e Argilominerais)

Atualmente são muitos os materiais estudados para fins manter uma liberação prolongada de medicamentos, os chamados nanocarreadores (GUNDUZ et al, 2013; OBEROI et al, 2013). Entre essas matérias encontram-se as argilas, que são comumente definidas como materiais naturais, terrosos, de granulação fina. As argilas possuem um diâmetro inferior a 2 µm, e são constituídas por compostos minerais. Entre os minerais que fazem parte das argilas estão os quartzo, feldspato, carbonatos, óxidos metálicos, que compreendem cerca de 10% das argilas, os outros 90% são argilominerais, por isso as argilas são comumente chamadas de argilominerais (COELHO e SANTOS, 2007a; TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009).

Os argilominerais (filossilicatos), são constituídos por elementos químicos como Al, Fe e Mg hidratados, com estruturas cristalinas em camadas de forma hexagonal, condensados em folhas de hidróxidos de metais trivalentes e divalentes. Eles apresentam estruturas em camadas, são hidrofílicos e conferem propriedades de plasticidade às argilas (COELHO e SANTOS, 2007a; TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009).

Os diferentes argilominerais são classificados conforme a composição química e estrutura cristalina das folhas tetraédricas e octaédricas, formando as lamelas. São classificados em grupo 1:1 e 2:1. Entre as estruturas 1:1 está a caulinita (mais abundante) e entre as estruturas 2:1 encontra-se o talco-pirofilita (COELHO e SANTOS, 2007a; TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009).

As argilas geralmente são materiais encontrados na natureza. Poucas são argilas industriais ou argilas especiais. Entre as industriais, estão a caulinita (caulin), talco, montmorilonita (bentonita); vermiculita e amianto crisotila. Já as argilas especiais foram desenvolvidas comercialmente para produtos novos ou incomuns, ou para aplicações específicas, entre as quais estão a hectorita, sepiolita e bentonita branca (COELHO e SANTOS, 2007a).

A possibilidade de modificação superficiais das argilas permite o desenvolvimento do seu uso para diversos tipos de aplicações tecnológicas, bem como a geração de novos materiais. Devido às propriedades que esses materiais apresentam tais como inchamento, adsorção, plasticidade e propriedades reológicas e coloidais tornam-nas interessantes para essas diferentes aplicações (PAIVA et al., 2008; TEIXEIRA NETO e TEIXEIRA-NETO 2009).

Uma das aplicações das argilas na qual vem sendo direcionada é na ciência dos materiais, onde se busca a obtenção das argilas organofílicas (argilas que contém moléculas orgânicas intercaladas entre as camadas estruturais) para aplicação em nanocompósitos poliméricos (PAIVA et al., 2008).

Os nanocompósitos são materiais formados por híbridos lamelares de materiais orgânicos e inorgânicos, onde a fase inorgânica está dispersa em nível nanométrico em uma matriz polimérica, onde a fase inorgânica pode ser de argila montmorilonita (PAIVA e DE MORALES, 2006).

As argilas e os argilominerais, naturais e sintéticos, são chamadas de “argilas catiônicas” pelas suas propriedades e estruturas cristalinas. Hidróxidos metálicos duplos

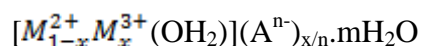
podem ser sintetizados com estruturas em camadas (hidróxidos duplos lamelares) geralmente do tipo da brucita, $Mg(OH)_2$ cristalino com uma deficiência de carga negativa estrutural, que é balanceada por ânions, mas com as mesmas propriedades físicas e químicas das argilas catiônica. Por esse motivo são chamadas de “argilas aniônicas” (COELHO e SANTOS, 2007b).

2.7 Hidróxidos Duplos Lamelares e Nanocarreamento de fármacos

Os sistemas de liberação de drogas atuam como reservatórios de fármacos, isto é, como sistema de liberação sustentada (ALLEN e CULLIS, 2004). Entre esses encontram-se os nanocarreadores que são materiais ou dispositivos de escala nanométrica (abaixo de 1 μm), feitos de diferentes materiais biodegradáveis naturais ou polímeros sintéticos, lípidos ou fosfolípidos ou de compostos organometálicos. Os nanocarreadores incluem uma variedade de sistemas tais como os polímeros, os microtubulos, lipossomos, entre outros (SANTILLI et al., 2009; GUNDUZ et al., 2013).

O nanocarreamento de fármacos exhibe muitas vantagens, já que ocorre um alcance na minimização da flutuação dos níveis plasmáticos e, portanto, redução dos efeitos colaterais dos fármacos, particularmente daqueles de elevada toxicidade, bem como maximização da resposta terapêutica desejada através (FRUTOS e DE VILLA, 2004; JAMZAD e FASSIHI, 2006).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são um tipo de nanocarreadores, conhecidos como compostos do tipo hidrotalcita, ou também como argilas aniônicas, são materiais híbridos sólidos inorgânicos. Os HDLs apresentam estruturas bidimensionalmente organizadas e poros flexíveis como os argilominerais (DEL ARCO et al., 2004, BI et al., 2014). Os hidróxidos duplos lamelares podem ser representados pela seguinte fórmula geral:



Onde: M = íon metálico

A^{n-} = ânion interlamelar

X = fração molar de M^{3+}

Os HDLs possuem ocorrência natural e também podem ser sintetizados em laboratório. Esta síntese ocorre por métodos diretos, dos quais o mais utilizado é o método de co-precipitação, ou métodos indiretos, como troca aniônica usando HDLs como precursores (CAO et al., 2011, BI et al., 2014).

Os HDLs também podem ser formados por uma reação de calcinação-reidratação (ou reconstrução). Este método consiste na mistura dos óxidos metálicos formados por calcinação de um precursor de HDL. Também podem ser re-hidratados na presença de moléculas de fármaco para reformar a estrutura de HDL com os ânions de fármacos intercalados. Algumas moléculas neutras também podem ser intercaladas com ânions por este método. O método hidrotérmico, no entanto, é usado principalmente para melhorar a cristalinidade e uniformidade de HDLs e pode ser menos aplicável no caso de nanohíbridos de droga-HDL se o fármaco tiver relativamente baixa estabilidade térmica (BI et al., 2014).

A síntese dos HDLs ocorre tanto na forma de cátions bivalente como trivalente ou ânions interlamelares, que podem ser de origem natural inorgânica ou orgânica (CAO et al., 2011). Estes sólidos podem trocar os ânions interlamelares, inorgânica como carbonato e nitratos, e orgânica tais como carboxilatos alifáticos, sulfonatos e fosfonatos (JAUBERTIE et al., 2006). A representação esquemática da estrutura dos HDLs é apresentada na Figura 4.

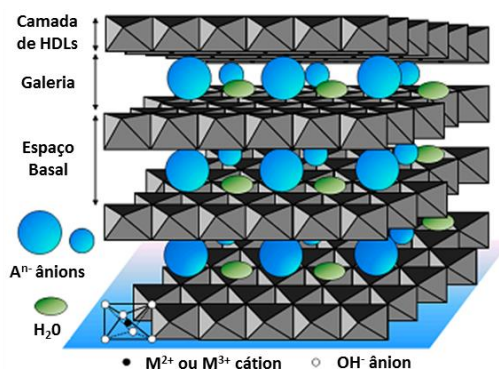


Figura 4: Estrutura dos Hidróxidos duplos lamelares (HDLs).
Fonte: BI et al, 2014.

Os HDLs tiveram um grande interesse nas últimas décadas, em diferentes campos, por causa das suas propriedades específicas, como as propriedades ácido-base, a propriedade de mistura homogênea de elementos dispersos intercalados nas camadas, a capacidade de recuperar a sua estrutura em camadas originais quando misturados em óxidos e a capacidade de troca iônica associada a um cátion não-bivalente (RIVES et al., 2013).

Dentre as aplicações dos HDLs mais utilizadas em estudos, estão a utilização desses compostos como excipientes farmacêuticos e em particular, como veículos de entrega de drogas (CAO et al., 2011; RIVES et al., 2013; GU et al., 2014).

Os ânions dos fármacos são liberados do invólucro de HDL por difusão da camada intercalar de HDL e ou pela dissolução da camada de HDL, e a liberação do fármaco apresenta um perfil de liberação sustentada, em que ocorre uma liberação inicial elevada que pode rapidamente estabelecer a dose terapêutica e a liberação prolongada subsequente mantém esta dose por um período de tempo (GU et al., 2014).

Os HDLs constituídos principalmente por magnésio e alumínio, que apresentam toxicidade nula, provavelmente estejam entre os sólidos mais promissores no uso como suporte, armazenamento e liberação gradual e controlada de fármacos, tais como anti-inflamatórios não esteroidais e anticancerígeno (AMBROGI et al., 2003; GORDIJO et al., 2005; CUNHA et al., 2016; SENAPATI et al., 2016). Dentre os estudos de intercalação de fármacos com HDLs, estão alguns anti-inflamatórios como indometacina (DEL ARCO, 2004), diclofenaco (CAO et al., 2011), naproxeno e ibuprofeno (GU et al., 2014).

Muitos pesquisadores têm conjugado uma variedade de forma negativa de medicamentos citotóxicos em HDLs e com sucesso os entregou nas células com propriedades de liberação controlada (BI et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Também observou-se um efeito positivo de HDLs intercalado em drogas anticancerígenas, como o metotrexato mostrando um efeito reduzido das células cancerígenas (KIM et al., 2014).

Os HDLs são um dos diversos meios de liberação controlada de fármacos, sendo um nanocarreador em que não acumula as partículas nas células devido a sua alcalinidade e capacidade de degradação em meio ácido, outras nanopartículas inorgânicas como silicatos mesoporosos podem ser conjugadas em fármacos, sondas e biomoléculas (KUTHATI et al., 2015). Assim, é altamente vantajoso se concentrar pesquisas no desenvolvimento de veículos de distribuição de drogas, tanto com HDLs quanto com outras formas de nanocarreadores de liberação controlada de fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fração ácida do óleo de copaíba, e da fração ácida do óleo de copaíba intercalada em Hidróxidos Duplos Lamelares.

3.1 Objetivos específicos

Determinar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fração ácida do óleo de copaíba, e da fração ácida do óleo de copaíba intercalada em Hidróxidos Duplos Lamelares *in vivo*, através da (o):

- Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE₅₀).
- Teste da contorção abdominal induzido pelo ácido acético.
- Teste da formalina.
- Dermatite induzida pelo óleo de cróton.
- Teste do edema de pata induzido por carragenina.
- Teste da peritonite, induzida por carragenina.

Analisar o efeito farmacológico exercido pela fração ácida do óleo de copaíba, em nanocarreadores de drogas, através da:

- Administração previa dos tratamentos em 1h, 24h ou 48h antes de cada experimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óleo de copaíba

O óleo de copaíba foi adquirido no mercado Ver-o-Peso em Belém-Pará, para a obtenção da fração ácida do óleo de copaíba, e da fração ácida do óleo de copaíba intercalada em nanocarreadores de Hidróxidos Duplos Lamelares.

4.2 Fração ácida do óleo de copaíba (FAOC)

A fração ácida do óleo de copaíba foi obtida pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Faculdade de Química da UFPA. A obtenção da FAOC foi feita por extração ácido-base, onde foi adicionado solução aquosa de KOH 5% no óleo de copaíba. A solução resultante foi extraída com acetato de etila. A fase aquosa foi acidificada com HCl, e extraída com acetato de etila. As fases orgânicas foram, secadas com Na₂SO₄ anidro, filtrada e a solução resultante concentrada em evaporador rotativo, fornecendo a fração ácida.

4.3 Fração ácida do óleo de copaíba intercalada em HDL (FAOC-HDL)

A intercalação da fração ácida em HDL foi realizada pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Química da UFPA, através do método de coprecipitação a pH 10 (constante), a uma temperatura de 150°C e tempo de 72h com razão molar Mg²⁺/Al³⁺=2.

4.3 Animais

O projeto desta pesquisa foi submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais de Experimentação da UFPA (CEUA/UFPA) e, os animais foram obtidos através dos pareceres de aprovação CEUA n° 6776250816, n° 7535231116 e n° 2652230817 (Anexos 1, 2 e 3). O manejo e uso dos animais foram de acordo com as normas do CONCEA e orientações do CEUA/UFPA.

Logo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) *swiss* machos, adultos, pesando entre 25g - 35g. Os animais foram provenientes do Instituto Evandro Chagas e mantidos em gaiolas de polietileno (n=6/caixa) forradas com maravalha, no biotério setorial da Faculdade de Farmácia da UFPA, sob condições controladas de temperatura (22 ± 3°C) e ciclo de claro/escuro de 12 horas (6h-18h). Os animais tiveram livre acesso a água filtrada e a ração industrial específica para roedores em forma de *pellets*.

4.4 Tratamentos

Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum alimentar por um período de 2 horas, para proporcionar absorção adequada dos fármacos. Após esse período, os grupos experimentais foram tratados pela via oral (v.o.), através de cânula orogástrica, em volume de 0,1mL/10g.

Os animais foram divididos em grupos experimentais contendo 6 animais/grupo. Os grupos experimentais foram: o controle negativo (veículo; óleo de milho), controle positivo (fármaco padrão), fração ácida do óleo de copaíba (FAOC), fração ácida do óleo de copaíba intercalada em HDL (FAOC-HDL) e grupo HDL. O grupo HDL tem por objetivo, identificar se além de proporcionar a liberação sustentada, a intercalação em HDL interfere no efeito farmacológico da FAOC-HDL. Todos os grupos foram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos experimentais.

A fim de avaliar o efeito farmacológico da fração ácida do óleo de copaíba intercalada em nanocarreadores de Hidróxidos Duplos Lamelares, os grupos experimentais de animais foram tratados 1 hora, 24 horas ou 48 horas antes de cada teste.

A distribuição dos animais em grupos e os tratamentos ocorreram conforme o delineamento experimental abaixo informado, e demonstrado na Figura 5.

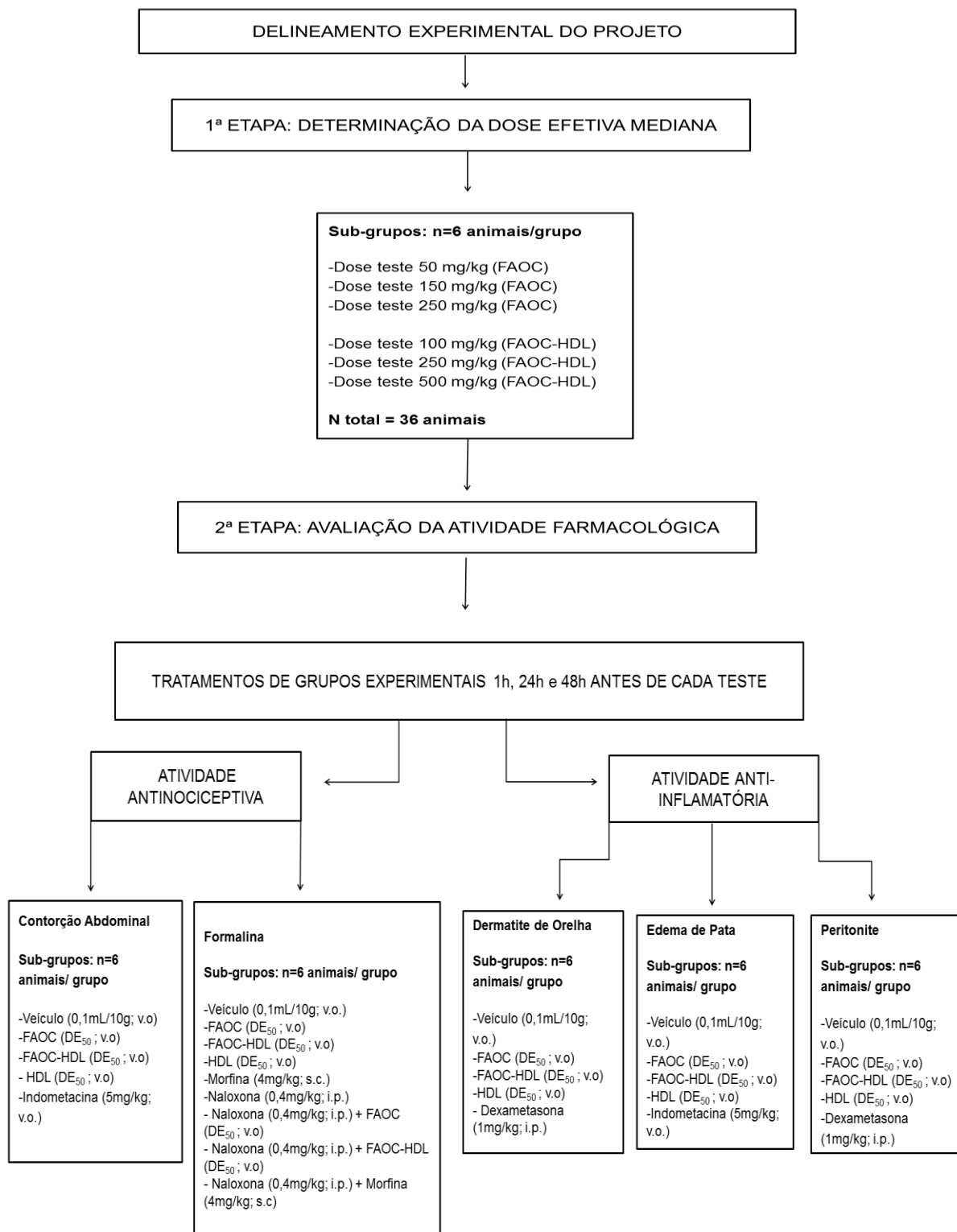


Figura 5: Tratamentos e distribuição dos grupos experimentais para avaliação da atividade farmacológica *in vivo*.

4.5 Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE₅₀)

A dose efetiva mediana (DE₅₀) foi determinada através do teste de contorção abdominal (KORSTER et al, 1959). Foram utilizadas as doses de 50, 150 e 250mg, para determinar a DE₅₀ da fração ácida do óleo de copaíba e, as doses de 100, 250 e 500mg, para determinar a DE₅₀ da fração ácida de óleo de copaíba intercalada em HDL.

As doses para a determinação da DE₅₀ foram selecionadas de acordo com a literatura, em artigos científicos onde foram avaliadas as atividades farmacológicas de óleo de copaíba (VEIGA JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2010).

Posteriormente, foi realizada a correlação linear entre as doses aplicadas no teste, e suas correspondentes porcentagens de inibição de contorções abdominais. Logo, foi realizado o teste estatístico de regressão linear, sendo possível encontrar a equação da reta e o coeficiente de correlação linear, e assim, calcular a DE₅₀.

4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.6.1 Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético

O teste de contorção abdominal, foi realizado de acordo com o método de Koster et al., (1959). As contorções abdominais consistem em movimentos estereotipados como: contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. As contorções abdominais foram induzidas através da administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% (solubilizado em solução fisiológica 0,9%), em volume de 0,1 mL a cada 10 g de peso do animal.

A intensidade da nocicepção foi quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 minutos, iniciando a contagem 10 minutos após a administração do ácido acético 0,6%. Durante o teste, os animais foram contidos individualmente em câmeras de observação com diâmetro de aproximadamente 22 cm.

4.6.2 Teste da Formalina

O teste da formalina foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Este teste consiste na administração de 20µL de formalina (formaldeído 1% em solução fisiológica 0,9%) no coxim plantar posterior direito dos animais. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente em câmeras de observação de 22 cm de diâmetro,

onde foi registrado o tempo de manifestação de resposta nociceptiva (gesto de lambar, morder ou agitar vigorosamente a pata injetada).

O tempo em que cada animal manifestou a reação foi cronometrado em duas fases: a primeira fase de 0 a 5 minutos (avalia a interferência sobre mecanismos neurais da dor) e a segunda fase, de 15 a 30 minutos (avalia mecanismos inflamatórios periféricos) (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

A fim de avaliar se há a participação de receptores opioides no mecanismo de ação, realizou-se um tratamento com naloxona 15 minutos após o tratamento com FAOC e FAOC-HDL.

4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.7.1 Dermatite induzida pelo Óleo de Cróton

Foi utilizado o método descrito por Tubaro et al., (1985). Os grupos de animais foram previamente anestesiados com Cetamina (72mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg) (solubilizados em solução salina), por via intraperitoneal. Após confirmação da anestesia, a dermatite foi induzida pela aplicação de 20 µL de óleo de cróton em acetona (2,5% v/v) na superfície externa da orelha direita. O mesmo volume de acetona foi aplicado na orelha esquerda.

Após 6 horas da indução do estímulo flogístico, os animais foram eutanasiados e uma amostra de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas, foram retiradas com auxílio de punch de biópsia. A resposta inflamatória, isto é o edema, foi medido em balança analítica através da diferença do peso entre a amostra da orelha estimulada (direita) e orelha controle (esquerda), expressando os resultados obtidos em miligrama (mg).

4.7.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina

O teste foi realizado conforme descrito por Winter, et al., (1962). Assim, foram administradas na região intraplantar da pata direita a carragenina (20 µL a 1%) e igual volume de solução fisiológica 0,9% na pata esquerda.

O edema foi medido pela diferença de volume, entre a pata direita e esquerda do animal. O desenvolvimento do edema foi avaliado em milímetros (mm) através de paquímetro digital (King Tools), medido imediatamente após a administração de carragenina e solução salina e, em intervalos de uma hora, durante cinco horas.

4.7.3 Peritonite induzida por carragenina

Este teste foi realizado conforme descrito por Souza e Ferreira (1985). A peritonite foi induzida através da injeção na cavidade peritoneal de camundongos, da solução de carragenina a 1% (500 µg/mL) preparada em salina estéril. Após 4 horas da injeção do estímulo, os animais foram sacrificados e foi injetado 3 mL de solução PBS heparinizada (1 mL / 1000 mL de PBS), na cavidade peritoneal. Alíquotas do lavado peritoneal foram coletadas e a migração celular foi analisada, através da contagem total e diferencial das células contidas na mesma.

Para realização da contagem total, 20 µL do lavado peritoneal foi diluído em 380 µL de solução de Turk, e contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, uma amostra do lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos na centrífuga Cytospin. Em seguida, as lâminas foram coradas com kit de corante panótico e as células contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em: neutrófilos e mononucleares.

O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) do número de células x 10⁶/mL de fluido peritoneal.

4.8 Fármacos, reagentes e soluções

- Acetona (Farmax)
- Ácido Acético Glacial P.A (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil)
- Carragenina Lambda (Sigma Chemical, CO., USA)
- Corante Pancrômico de Rosenfeld
- Cloridrato de dexamesanosa (Aché, Brasil)
- Cloridrato de ketamina (Vetanarcol, Argentina)
- Cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil)
- Formaldeído P.A (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil)
- Indometacina (Sigma Chemical, CO., USA)

- Óleo de cróton (Sigma Chemical, CO., USA)
- Naloxona (Cristália, SP, Brasil)
- Salina Tamponada com fosfato (PBS)
- Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%
- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar)
- Sulfato de morfina (Cristália, RJ, Brasil)

4.9 Equipamentos e aparelhos

- Balança analítica modelo FA2104N (Bioprecisa)
- Balança digital modelo ID-1500 (FILIZOLA)
- Câmara de Neubauer
- Centrífuga citológica modelo ALB 12 CC (Inbras)
- Microscópio optico modelo B20 (Bioptika)
- Paquímetro digital modelo 150/6 (King Tools)

4.10 Análise Estatística

Para comparação das médias entre os grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida de um pós-teste (Holm-Sidak). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE₅₀)

5.1.1 Fração ácida do óleo de copaíba

O tratamento oral com a fração ácida do óleo de copaíba (FAOC), nas doses de 50, 150 e 250 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais de modo dose dependente em: 26,6%; 61,7% e 83,3%, respectivamente, quando comparado com o veículo. Também foi observada uma diferença estatística entre todas as doses conforme aumento dessas doses (Figura 6, A). Posteriormente, foi determinada a DE₅₀ de 98 mg/kg (Figura 6, B).

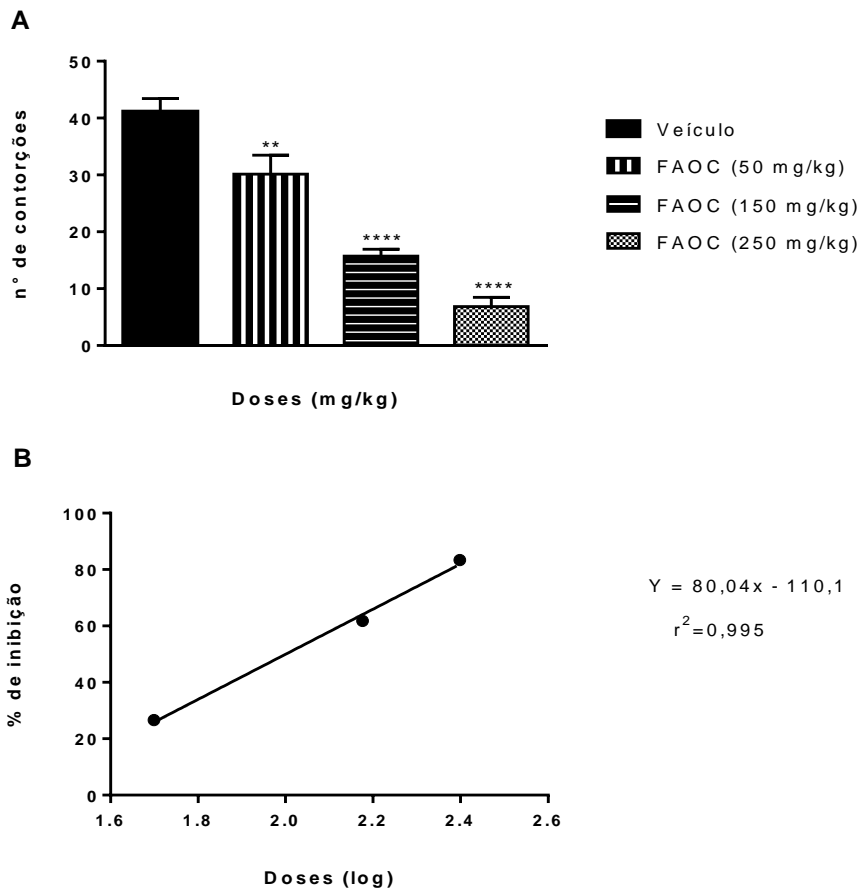


Figura 6: Efeito do tratamento oral com diferentes doses da FAOC, na contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak (A). A linha representa a regressão linear calculada para os dados e R^2 o coeficiente de correlação (B).

5.1.2 Fração ácida do óleo de copaíba, intercalada em nanocarreadores de Hidróxidos Duplos Lamelares

Por sua vez, o tratamento oral com a fração ácida do óleo de copaíba intercalada em HDL (FAOC-HDL), nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, foi capaz de reduzir as contorções abdominais de modo dose dependente em: 21,4%; 53,2% e 79,6%, respectivamente quando comparado com o veículo. Também foi observada uma diferença significativa entre as doses (Figura 7, A). A DE_{50} obtida foi de 222,9 mg/kg (Figura 7,B).

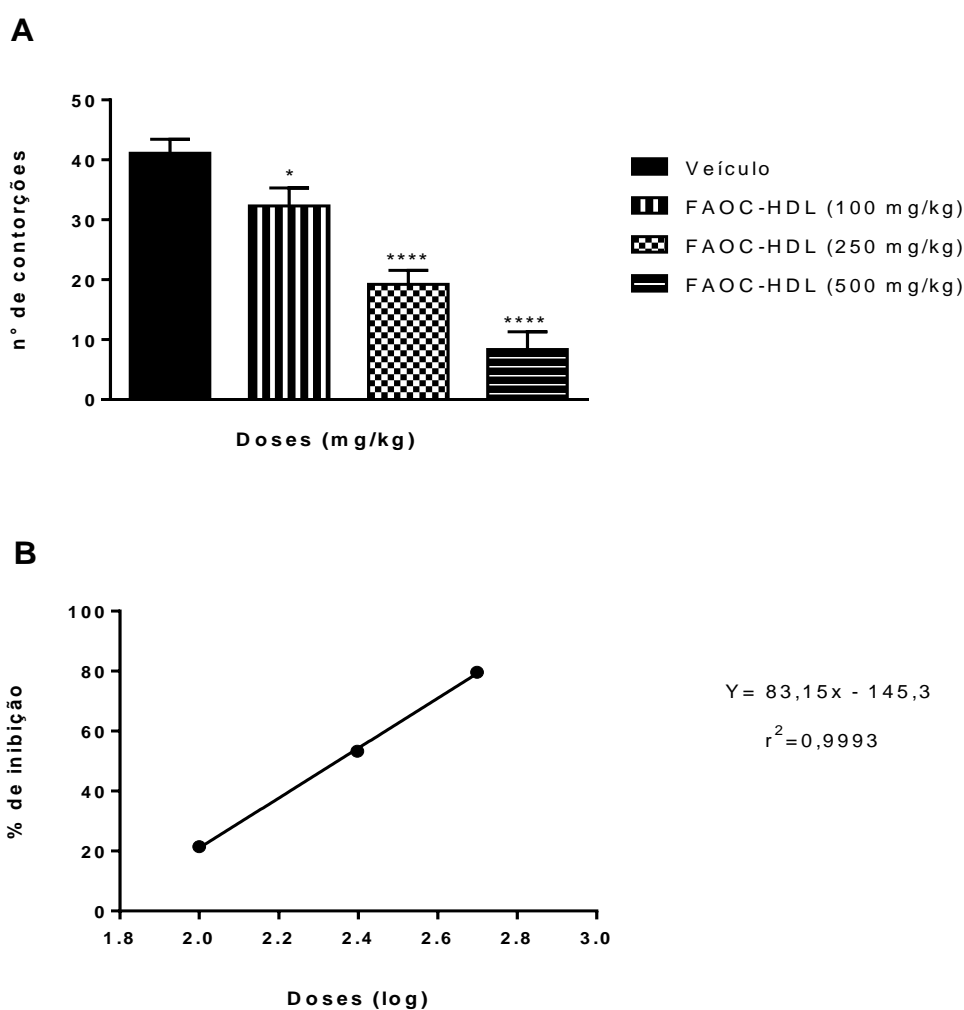


Figura 7: Efeito do tratamento oral com diferentes doses da FAOC-HDL, na contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak (A). A linha representa a regressão linear calculada para os dados e R^2 o coeficiente de correlação (B).

5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

5.2.1 Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético

O tratamento oral 1h antes do estímulo flogístico com FAOC (98 mg/kg) e com a FAOC-HDL (222,9 mg/kg), inibiram significativamente as contorções abdominais em 49,99% ($22,67 \pm 1,56$) e 56,99% ($19,5 \pm 2,69$), respectivamente. A Indometacina (5 mg/kg; controle positivo) reduziu o número de contorções em 84,93% ($6,83 \pm 1,66$) quando comparado ao controle negativo ($45,33 \pm 2,63$) (Figura 8 A).

Após 24h do tratamento, os resultados obtidos demonstraram que, apenas a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções nos animais, e este efeito foi de 58,34% ($20,0 \pm 3,97$), quando comparado ao controle negativo ($48,0 \pm 3,27$) (Figura 8, B). Por sua vez, não foi observada a redução do número de contorções abdominais nos tratamentos realizados 48 horas antes do teste (Figura 8 C).

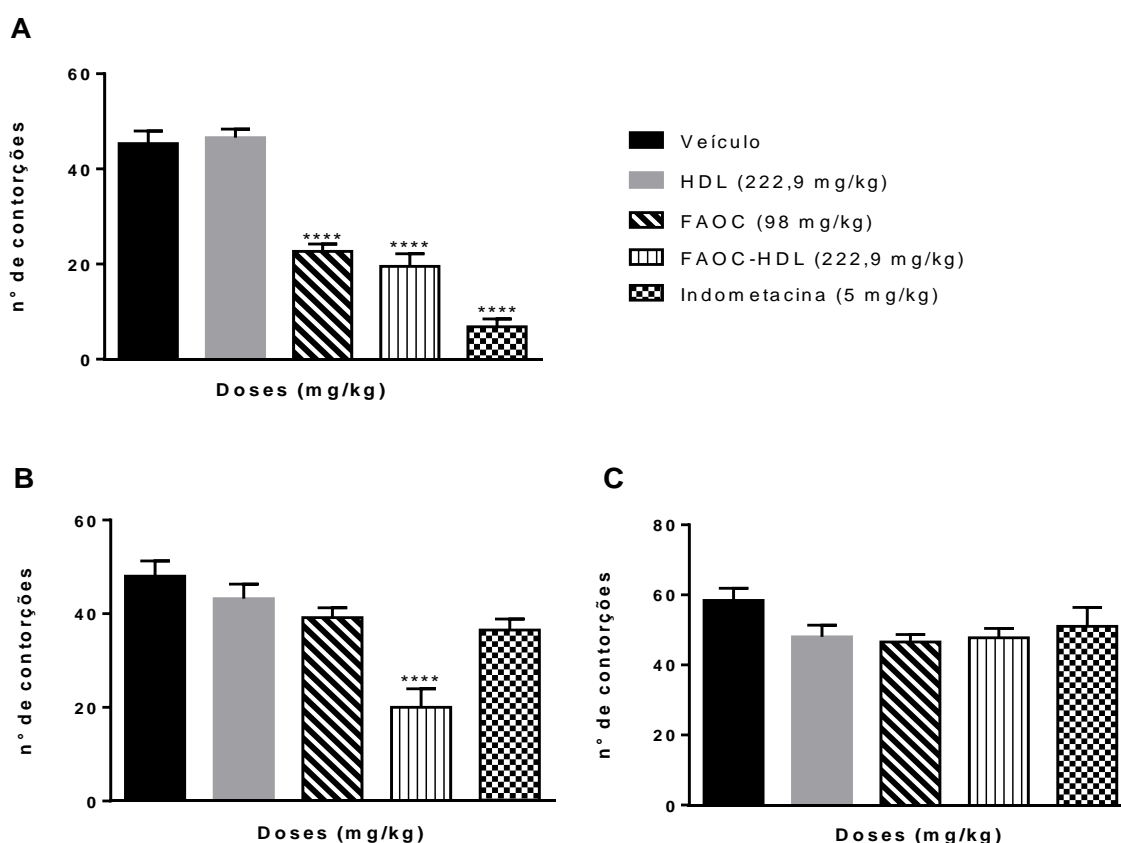


Figura 8: Efeito sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%), do tratamento oral com: veículo (0,1mL/10g), HDL (222,9 mg/kg), FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste (n = 6/ grupo). Os dados representam a média \pm E.P.M. **** $P < 0.0001$. ANOVA seguida de Holm-Sidak.

5.2.2 Teste da formalina

O tratamento realizado 1h antes do teste da formalina, com a FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg), não exerceu efeito significativo na 1ª fase do teste, quando comparado com o controle negativo. Diferentemente, na 2ª fase do teste, estes tratamentos reduziram significativamente o tempo de lambida, em respectivamente 28,93% ($113,6 \pm 12,45$) e 60,79% ($62,67 \pm 11,02$), quando comparados com o controle negativo ($159,83 \pm 11,01$). A Morfina (4 mg/kg, controle positivo) reduziu significativamente o tempo de lambida na 1ª fase do teste em 80,78% ($13,33 \pm 2,4$) e, na 2ª fase em 96,67% ($5,33 \pm 1,26$), quando comparada ao controle negativo ($69,33 \pm 9,46$) (Figura 9 A).

O tratamento prévio 24h antes do teste demonstrou redução significativa do tempo de lambida na 2ª fase, apenas no tratamento com a FAOC-HDL (222,9 mg/kg). Este efeito foi de 33,97% ($98,83 \pm 13,64$), quando comparado ao controle negativo ($149,7 \pm 10,26$) (Figura 9 B). Não foi observado efeito significativo nos tratamentos realizados 48h antes do teste da formalina (Figura 9 C).

5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.3.1 Teste da dermatite induzida pelo óleo de cróton

O tratamento oral 1h antes do teste, com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) inibiu significativamente em, respectivamente, 25,59% ($2,53 \pm 0,21$) e 47,65% ($1,78 \pm 0,20$) o edema, quando comparado ao veículo ($3,40 \pm 0,23$). A Dexametasona (1 mg/kg, controle positivo) reduziu o edema em 66,77% ($1,13 \pm 0,15$), quando comparada com o veículo ($3,40 \pm 0,23$) (Figura 10, A).

Por sua vez, os tratamentos realizados 24h antes do teste, apenas a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente o edema. Este efeito foi de 57,05% ($2,47 \pm 0,36$), quando comparado ao controle negativo ($5,75 \pm 0,20$) (Figura 10, B). Não houve efeito significativo para reação do edema, nos tratamentos realizados 48 horas antes dos testes (Figura 10 C).

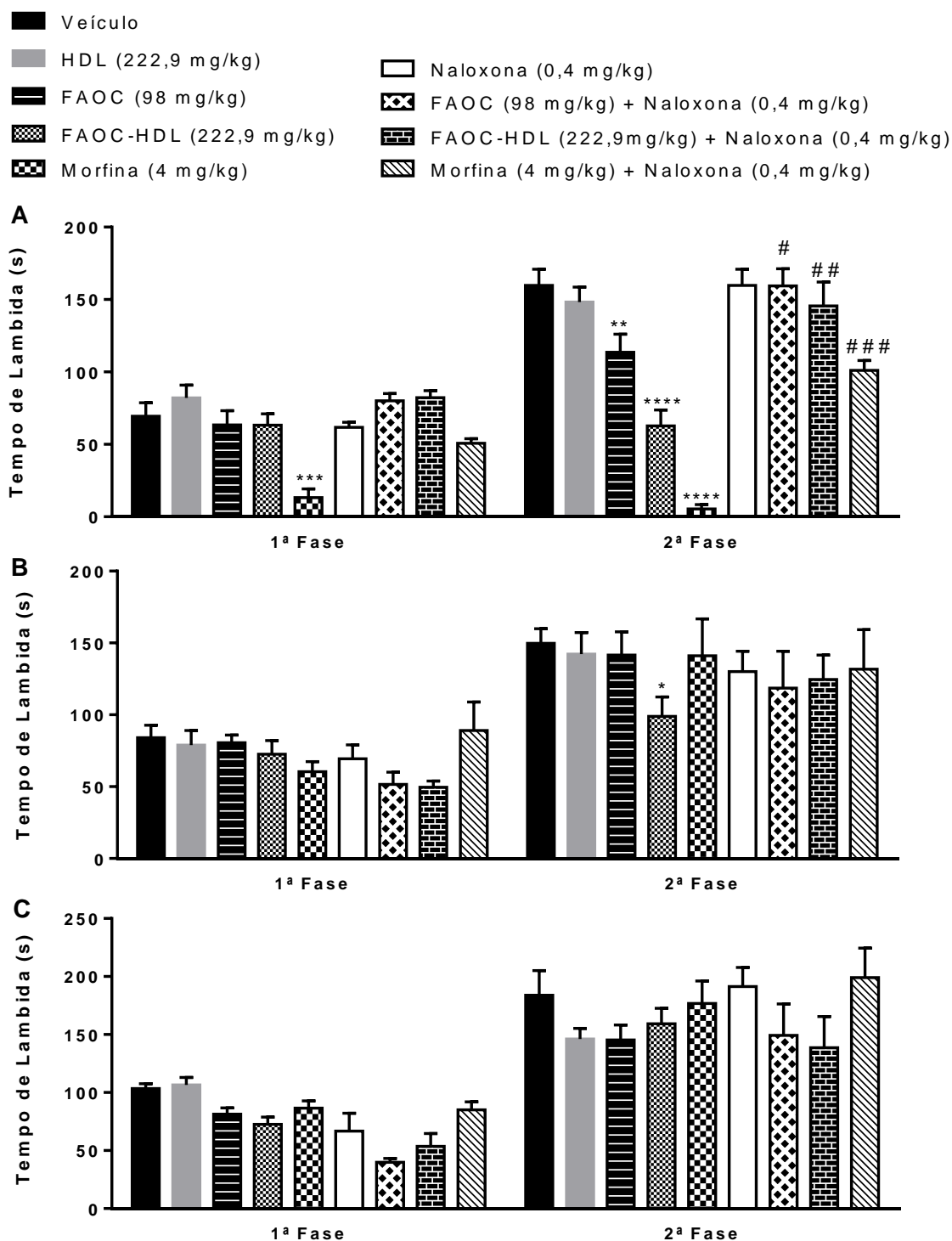


Figura 9: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Morfina (4 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste da formalina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6 por grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$;**** $P < 0,0001$. ANOVA seguido de Holm-Sidak. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo FAOC; ## $P < 0,05$ quando comparado ao grupo FAOC-HDL; ### $P < 0,05$ quando comparado ao grupo morfina.

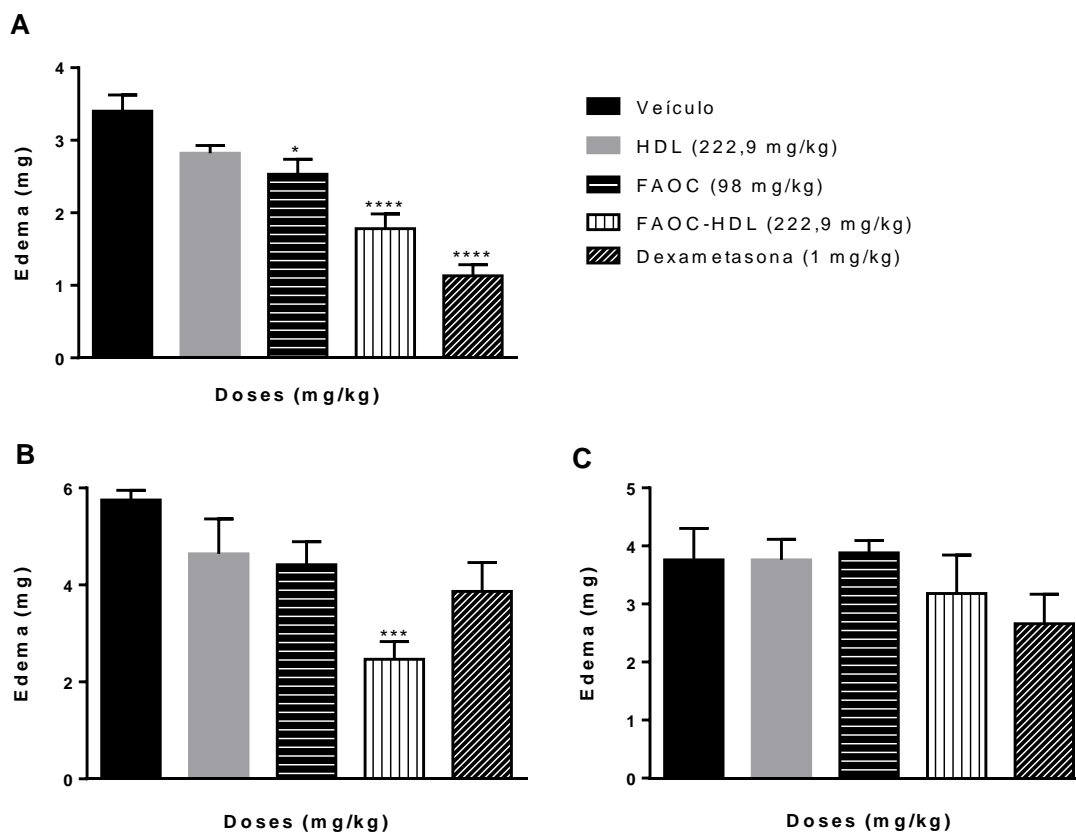


Figura 10: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste de dermatite de orelha. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. ANOVA seguido de Holm-Sidak.

5.3.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina

Após 1 hora do tratamento oral com FAOC (98 mg/kg), observou-se redução significativa do edema na 2^a e 3^a hora do teste em 39,29% ($0,17 \pm 0,03$) e 36,37% ($0,21 \pm 0,03$), quando comparado ao veículo ($0,28 \pm 0,02$) e ($0,33 \pm 0,03$) respectivamente. Por sua vez, o tratamento com FAOC-HDL (222,9 mg/kg), também reduziu significativamente o edema na 2^a e 3^a hora do teste, em 53,58% ($0,13 \pm 0,01$) e 48,49% ($0,17 \pm 0,02$), quando comparado ao veículo ($0,28 \pm 0,02$) e ($0,33 \pm 0,03$). A Indometacina (5 mg/kg; controle positivo) reduziu significativamente o edema na 2^a hora do teste em 35,72% ($0,18 \pm 0,03$) e na 3^a hora do teste em 45,46% ($0,18 \pm 0,04$), quando comparados com o veículo ($0,28 \pm 0,02$) e ($0,33 \pm 0,03$) (Figura 11 A).

No tratamento realizado 24h antes do teste, apenas a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) inibiu significativamente o edema. Este efeito foi observado na 3^a hora do teste, e a inibição foi de 30,77%, ($0,27 \pm 0,02$) quando comparado ao veículo ($0,39 \pm 0,03$) (Figura 11, B). Não houve

efeito significativo na redução do edema, para os tratamentos realizados 48 horas antes dos testes (Figura 11 C).

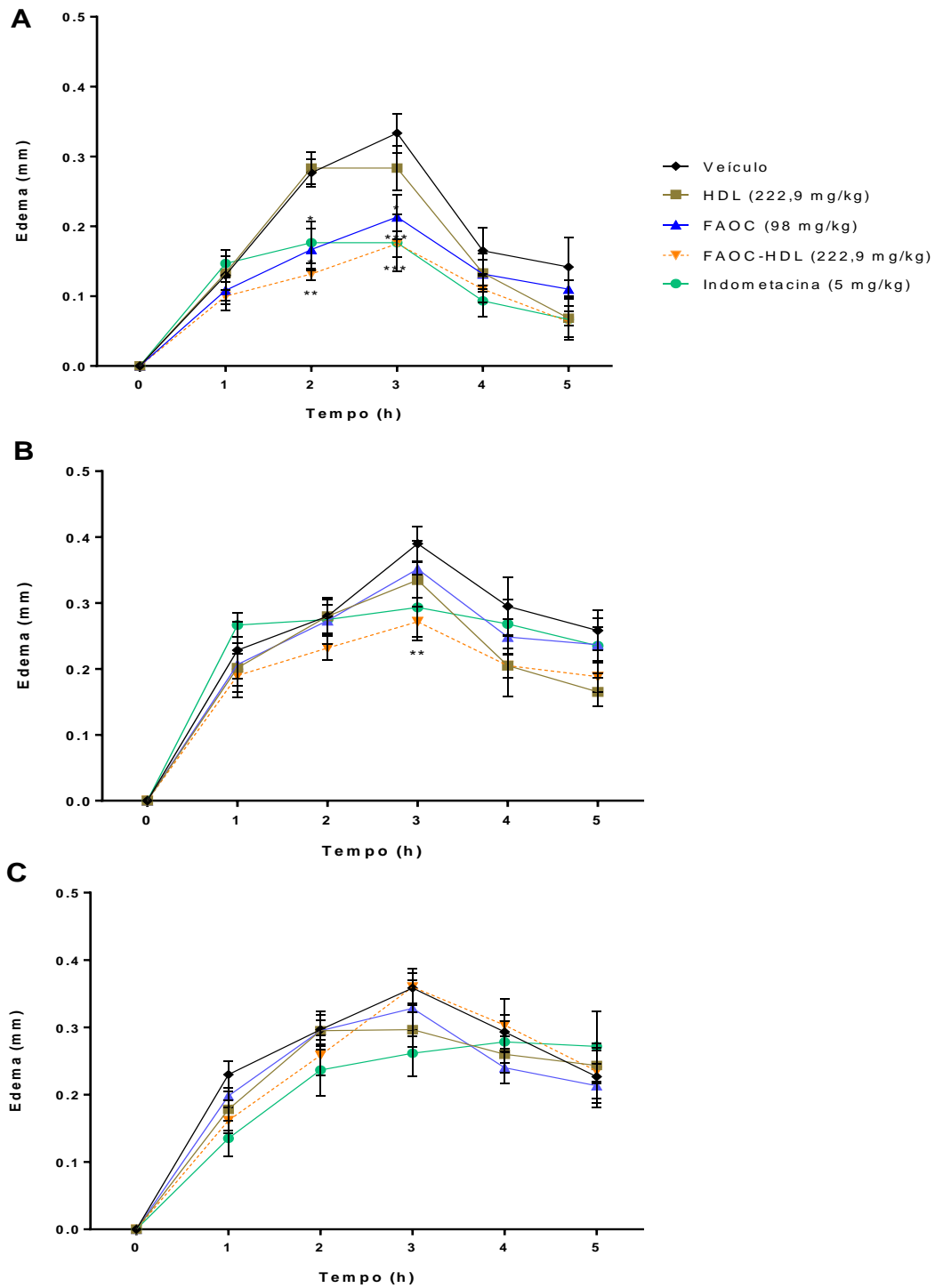


Figura 11: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), 1h (A), 24h (B) e 48h (C) antes do teste de edema de pata induzido por carragenina 1%. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. ANOVA de 2 vias seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

5.3.3 Teste da peritonite induzida por carragenina

O tratamento prévio de 1 hora antes do teste, com FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) e Dexametasona (1 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente a migração de leucócitos totais em 73,17% ($1,95 \pm 0,38$), 75,69% ($1,77 \pm 0,28$) e 75,92% ($1,75 \pm 0,20$) respectivamente, quando comparado ao controle negativo ($7,27 \pm 0,67$) (Figura 12 A). Não foi observada a redução da migração de leucócitos totais, nos tratamentos realizados 24h antes do teste. (Figura 12 B).

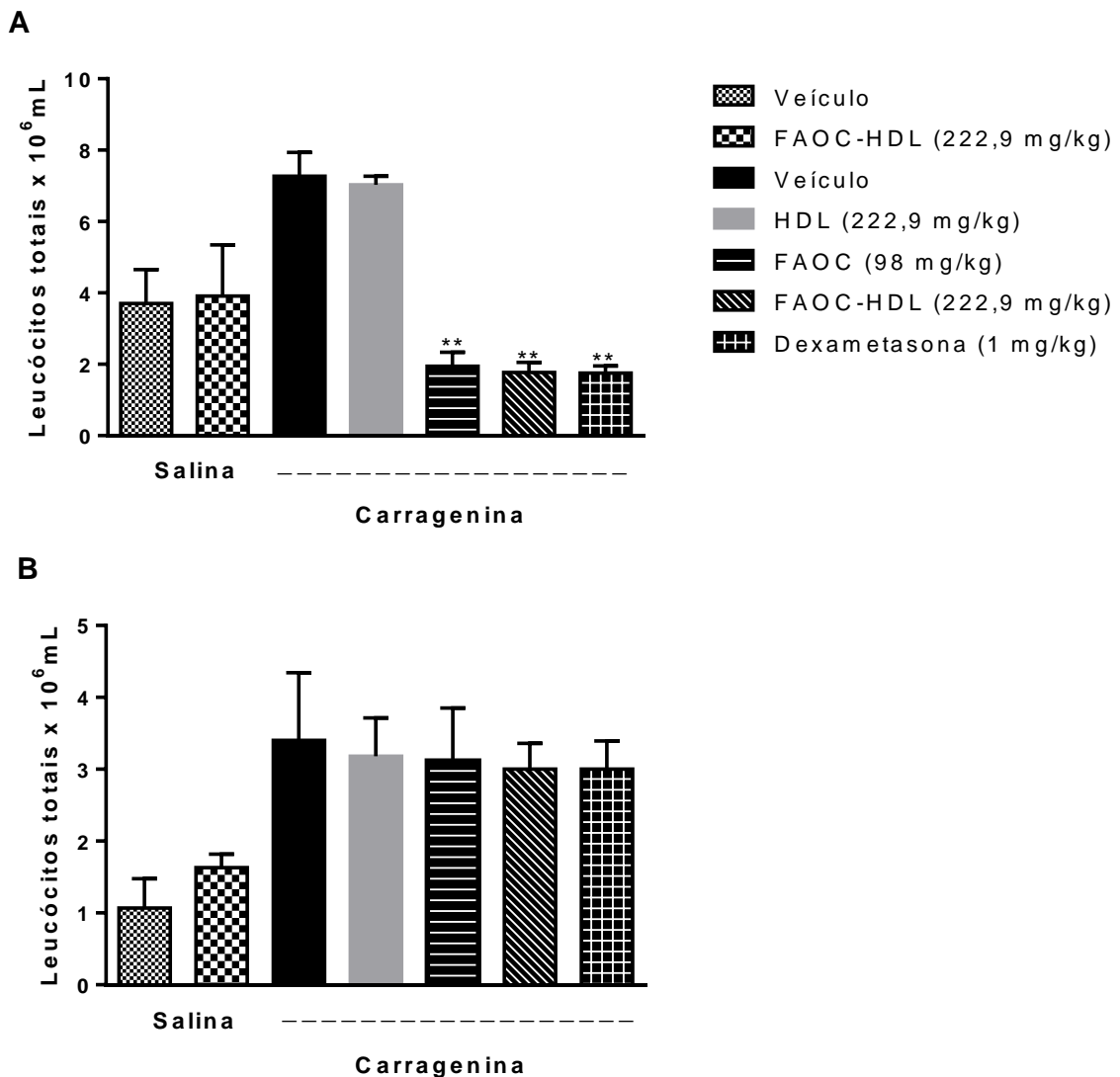


Figura 12: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A), 24h (B)) antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de leucócitos totais. Cada valor representa a média \pm E.P.M. ($n = 6$ /grupo). ** $P < 0,01$, significante em relação ao veículo (carragenina). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Com relação às células diferenciais, observou-se que o tratamento prévio de 1 hora antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, com FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) e Dexametasona (1 mg/kg), foram capazes de reduzir significativamente a migração de neutrófilos, em: 62,82 (1,61±0,31), 91,0% (0,39 ± 0,10) e 72,75% (1,18 ± 0,28), respectivamente, quando comparado ao controle negativo (4,33 ± 0,85) (Figura 13 A). Não foi observada a redução da migração de neutrófilos, nos tratamentos realizados 24h antes do teste (Figura 13 B).

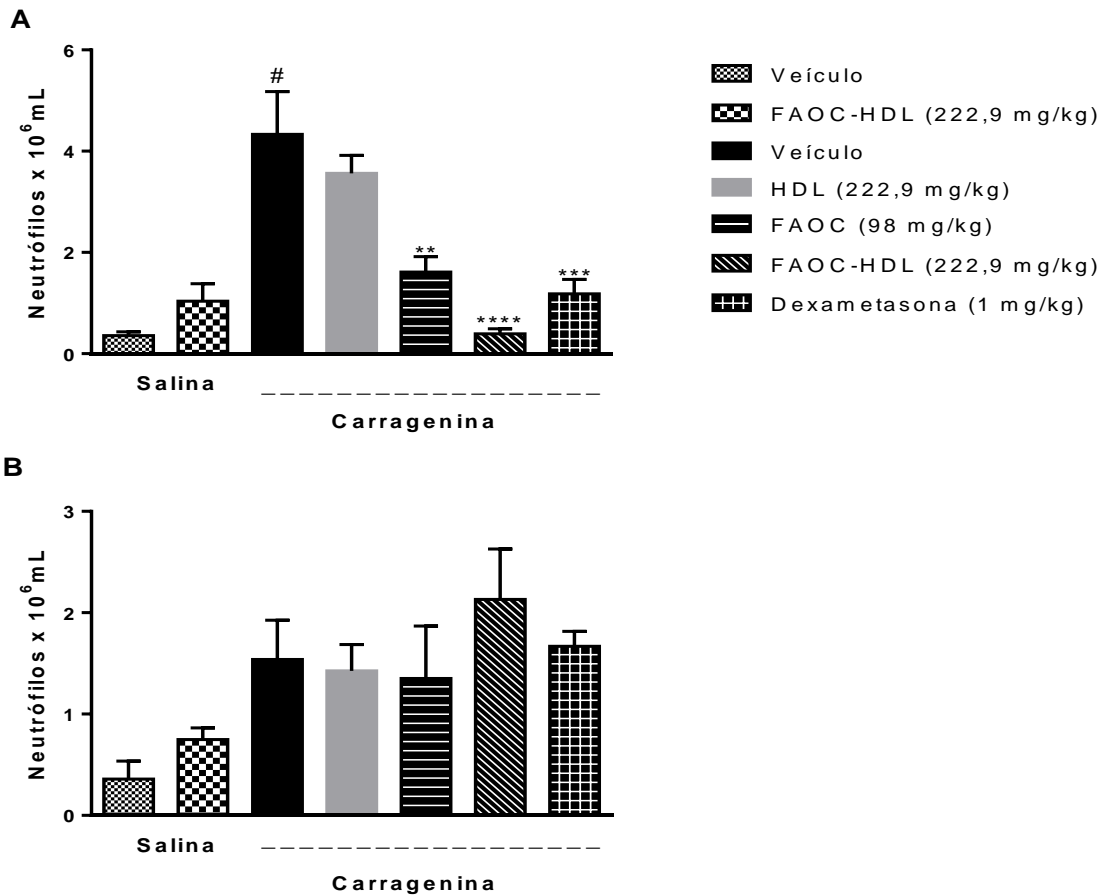


Figura 13: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A) e 24h (B), antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de neutrófilos. Cada valor representa a média ± E.P.M. (n = 6/grupo). ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *****P* < 0,0001 significativa em relação ao veículo (carragenina). #*P* < 0,0001 significativa em relação ao veículo (salina). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Não houve redução significativa sobre a migração de células mononucleares, nos tratamentos realizados 1h, e 24h antes do teste (Figura 14 A, B).

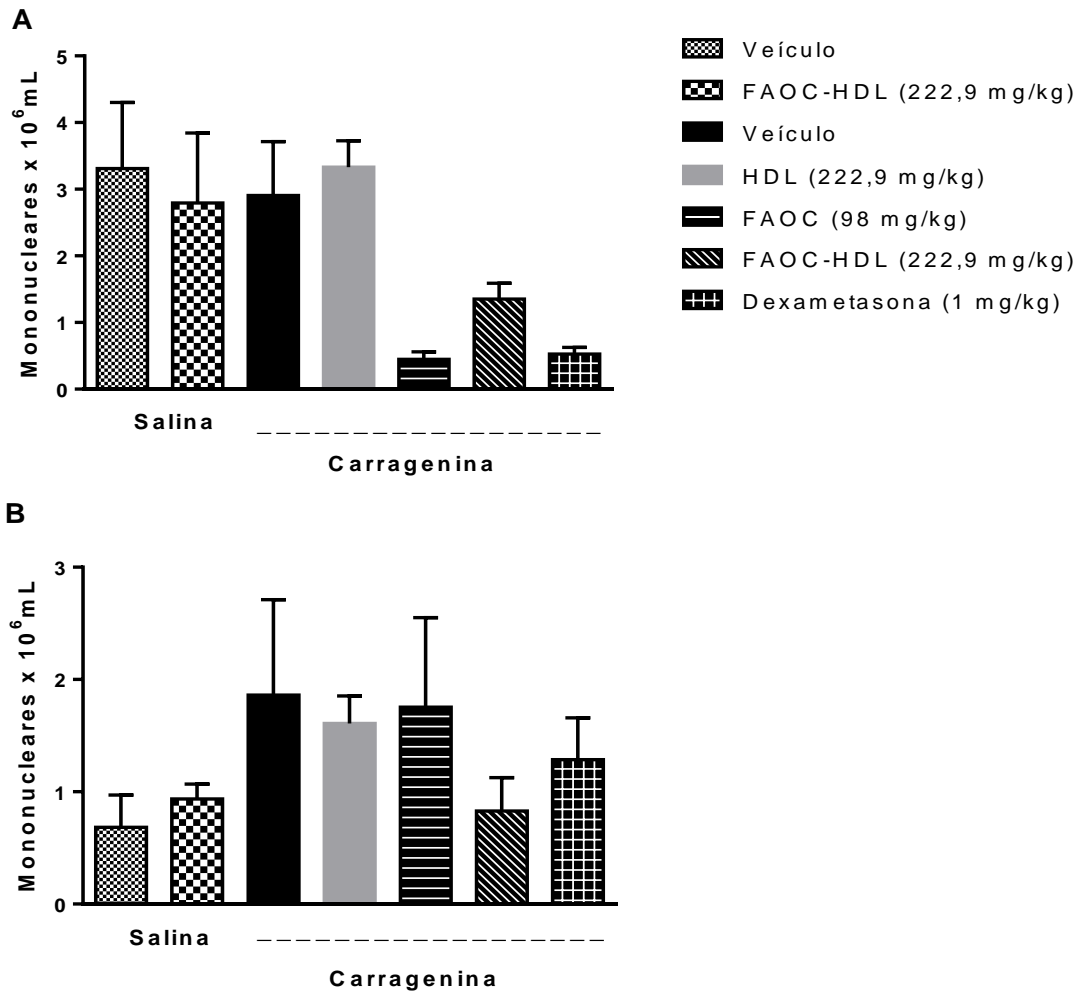


Figura 14: Efeito dos tratamentos com: veículo (0,1 mL/10g); HDL (222,9 mg/kg); FAOC (98 mg/kg); FAOC-HDL (222,9 mg/kg) ou Dexametasona (1 mg/kg), 1h (A) e 24h (B), antes do teste da peritonite induzida por carragenina 1%, sobre a migração de células mononucleares. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n = 6/grupo). ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa estudou a aplicabilidade farmacológica do nanocarreamento de fármacos, sobre um produto natural da Amazônia, de grande uso popular nesta região.

O uso de produtos naturais para o tratamento das mais diversas enfermidades é registrado desde a antiguidade, sendo considerado para diversas populações, o principal recurso terapêutico. Esta realidade não é diferente na região amazônica do Brasil, a qual se sobressai por deter a maior biodiversidade do planeta, e nela existir muitas espécies vegetais com propriedades terapêuticas (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

Dentre as plantas medicinais de grande importância terapêutica encontrada na região amazônica do Brasil, destacam-se as plantas do gênero *Copaifera*. Isto se deve a obtenção, a partir da perfuração do tronco das suas árvores, de uma óleo resina denominada popularmente de “óleo de copaíba” (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; PIERI et al., 2009).

Esta óleo resina é muito utilizada pela população local na medicina tradicional, para o tratamento da inflamação e cicatrização. Devido ao amplo consumo, este óleo pode ser facilmente adquirido em feiras e mercados livres, assim como, em farmácias da região (CASCON e GILBERT, 2000; MACIEL et al., 2002).

Diante da importância etnofarmacológica, diversos estudos científicos foram realizados com o óleo de copaíba e descrevem que esta óleo resina possui propriedades farmacológicas, tais como: anti-inflamatória, antinociceptiva, atividade antineoplásica e antimicrobiana (VEIGA JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al, 2008; GOMES et al, 2010; SOUZA et al, 2011a).

Considerando que, dentre seus constituintes, o ácido copálico foi identificado na óleo resina de muitas espécies de *Copaifera* estudadas, despertou-se também o interesse da comunidade científica em investigar suas propriedades farmacológicas. (VEIGA JÚNIOR et al, 2007; GOMES et al, 2010). Logo, foi descrito em estudos *in vitro*, que o ácido copálico isolado do óleo de espécies de *Copaifera*, possui ação antibacteriana, antiparasitária e anti-inflamatória (SARTORELLI et al, 2010; LIU e NAIR, 2011; SOUZA et al., 2011; IZUMI et al, 2012). O ácido copálico está majoritariamente presente na fração ácida do óleo de copaíba (GOMES et al., 2010; GELMINI et al., 2013; LAMA et al., 2014).

Desta forma, nota-se quão importante se faz a busca constante da ciência por novos princípios ativos com propriedades terapêuticas, para o tratamento das mais diversas doenças que acometem a humanidade (QUEIROZ et al., 2012). Entretanto, além da busca por novos

princípios ativos, é importante também, o estudo de novas tecnologias que venham adicionar benefícios ao tratamento farmacológico.

Uma estratégia importante para minimizar os efeitos colaterais de fármacos, pode ser através da modificação da sua forma de administração. Dessa maneira, a liberação controlada oferece várias vantagens quando comparados à administração convencional de fármacos (ERTEKIN et al., 2015). Isto se justifica, devido à possibilidade da redução da toxicidade de drogas, liberação sustentada, aumento da eficácia do medicamento e diminuição das quantidades terapêuticas necessárias (HO, et al., 2012; MONDAL et al., 2016).

Para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas, têm se investigado nas últimas décadas, o uso de nanocarreadores no encapsulamento de fármacos (GUNDUZ et al., 2013; OBEROI et al., 2013). Dentre os nanocarreadores usados como sistemas de liberação de fármacos, têm-se os hidróxidos duplos lamelares (HDL), que são materiais inorgânicos biodegradáveis, que podem ser sintetizados em laboratório, e estudos confirmam a sua ação na liberação controlada de drogas (AMBROGI et al., 2001; AMBROGI et al., 2003; LI et al., 2004; CAO et al., 2011; RIVES et al., 2013).

Logo, considerando a importância terapêutica e grande uso do óleo de copaíba pela população amazônica, para o tratamento da dor e inflamação, surgiu o interesse em avaliar *in vivo* os efeitos farmacológicos da fração ácida do óleo de copaíba (FAOC), sobre a dor e a inflamação. A escolha desta fração se deve por conter majoritariamente, o ácido copálico, constituinte de grande potencial terapêutico, como descrito em pesquisas prévias.

Além disso, neste projeto, a fração ácida do óleo de copaíba também foi intercalada em nanocarreadores de HDL (FAOC-HDL), a fim de avaliar o seu efeito farmacológico em nanocarreadores de fármacos.

Os resultados obtidos foram comparados com a fração não intercalada, assim como, com fármaco anti-inflamatório já comercializado no mercado farmacêutico.

Para alcançar os objetivos propostos, faz-se necessário a pesquisa em modelos *in vivo* de dor e inflamação, a fim de aproximar os resultados obtidos com o uso clínico em humanos.

Assim, o estudo foi iniciado pela determinação da DE₅₀ da Fração ácida de óleo de copaíba (FAOC) e, da DE₅₀ da Fração ácida de óleo de copaíba intercalada em HDL (FAOC-HDL).

A DE_{50} consiste em uma concentração de fármaco que possui 50% da resposta máxima, ou seja, a DE_{50} é a concentração eficaz para produzir 50% de resposta farmacológica máxima (BRUTON et al., 2012).

Além disso, o uso da DE_{50} é importante em pesquisas científicas usando animais de experimentação, pois permite usar apenas uma dose nos testes farmacológicos, e assim, reduzir o número de animais na pesquisa quando comparado com estudos que utilizam testam várias doses.

Os resultados obtidos na determinação da DE_{50} da FAOC foi de 98 mg/kg (Figura 6 B), e da FAOC-HDL foi de 222,9 mg/kg (Figura 7 B). O mesmo valor de DE_{50} da FAOC-HDL (222,9 mg/kg) foi usada para dose dos grupos tratados apenas com HDL.

A DE_{50} da FAOC-HDL (222,9 mg/kg) encontrada foi maior que a DE_{50} da FAOC 98 mg/kg. Entretanto, para a comparação adequada da potência entre ambas DE_{50} testes adicionais para quantificação exata da fração ácida do óleo de copaíba que foi intercalada em HDL, são importantes.

Entretanto, as DE_{50} encontradas apresentaram melhor resultado nos testes farmacológicos realizados, quando comparadas a pesquisas científicas publicadas com o óleo bruto de copaíba. Comparando as doses utilizadas na literatura com óleos bruto de copaíba, estas variaram entre 50 mg/kg a 1802 mg/kg para obtenção de efeito farmacológico nos testes de nocicepção e inflamação (CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2007).

Após a determinação das DE_{50} , estas doses foram usadas nas avaliações farmacológicas seguintes. Em continuidade, foi avaliada a atividade antinociceptiva periférica, através do teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético 0,6%. Neste modelo experimental, ocorre um estímulo químico causado pelo ácido acético que induz mediadores inflamatórios como prostaglandinas (DERAEDT et al., 1980, MATSUMOTO et al., 1998, VERRI JÚNIOR et al., 2006) bradicinina, (CORREA et al., 1996), histamina (COLLIER et al., 1968), substância P, (GOETTL e LARSON, 1998) bem como, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-8 e TNF- α (RIBEIRO et al., 2000; VERRI JÚNIOR et al., 2006).

O tratamento oral 1h antes do teste com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) inibiu significativamente o número de contorções abdominais induzida por ácido acético 0,6% em 49,99% e 56,99% respectivamente. (Figura 8 A). Assim, sugere-se que ambos os tratamentos foram capazes de inibir a indução dos mediadores tais como histamina, bradicinina prostaglandinas, substância P e citocinas.

Estudos indicam uma redução do efeito inflamatório periférico nesse modelo de avaliação com óleo bruto de copaíba, com doses de 517 mg/kg, 1035 mg/kg e 1802 mg/kg (CARVALHO et al., 2005). Assim, como demonstrado, a FAOC (98 mg/kg) demonstra ter resultado semelhante, em menor dose, quando comparado com as doses utilizadas para os óleos brutos de copaíba.

O tratamento oral com FAOC-HDL (222,9 mg/kg) 24 horas antes do teste, reduziu significativamente em 58,34% o número de contorções abdominais, quando comparado ao controle negativo (Figura 8 B). Este dado demonstra efeito prolongado até esse período. Este dado é importante, pois se observa um efeito prolongado da FAOC-HDL (222,9 mg/kg), inibindo a indução dos mediadores tais como histamina, bradicinina prostaglandinas, substância P e citocinas até 24h após o tratamento.

A partir dos resultados obtidos, foi realizado o teste da formalina. Este teste é utilizado tanto para avaliar drogas que atuam no sistema nervoso central, como fármacos anti-inflamatórios, esteroidal e não esteroidal. O modelo experimental é caracterizado por duas fases, a primeira avalia a dor neurogênica e há a participação da substancia P, bradicinina, glutamato e serotonina. A segunda fase avalia a dor de origem inflamatória, sendo observada a participação de mediadores como histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; ROSLAND et al., 1990; HUSSEY et al., 2007).

Os fármacos que atuam principalmente como analgésicos centrais inibem ambas as fases, enquanto os fármacos de ação periférica inibem apenas a 2ª fase (SHIBATA et al., 1989; ROSLAND et al., 1990).

O tratamento oral 1h antes do teste com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) inibiu significativamente em 28,93 % e 60,79% respectivamente o tempo de lambidas da pata na 2ª fase do teste, diferentemente do tratamento com HDL (222,9 mg/kg), onde não foi observado o mesmo efeito (Figura 9 A). Como esperado, o fármaco padrão opióide Morfina (4 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de lambida nas duas fases do teste (Figura 9 A).

Não foi observada uma redução do tempo de lambida da pata na 1ª fase do teste da formalina com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg). Isto significa que, os tratamentos possuem uma atividade periférica, ao inibir significativamente a dor de origem inflamatória. Possivelmente esta ação ocorreu através da redução da síntese ou bloqueio dos receptores da histamina, bradicinina e prostaglandinas.

Os resultados mostraram que a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) demonstrou melhores resultados que a FAOC (98 mg/kg), visto que obteve maior porcentagem de redução no tempo de lambidas das patas nos animais tratados (Figura 9 A).

Os resultados obtidos na 2ª fase do teste de formalina foram semelhantes aos encontrados nos estudos com óleo de copaíba bruto e frações hexânica, clorofórmica e metanólica da espécie *Copaifera multijuga* (GOMES et al., 2007; GOMES et al., 2010).

O tratamento oral com FAOC-HDL (222,9 mg/kg) realizado 24 horas antes do teste da formalina, reduziu significativamente o tempo de lambidas na pata (Figura 9, B). Assim como foi observado no teste de contorção abdominal, houve um efeito prolongado da fração ácida do óleo de copaíba até 24h após o tratamento, exercendo o efeito farmacológico na dor inflamatória, possivelmente pela inibição dos receptores ou inibição da síntese das prostaglandinas, das histaminas e ou bradicinina.

Para avaliar a ação farmacológica da FAOC (98 mg/kg) e da FAOC-HDL (222,9 mg/kg), sobre diferente evento e mecanismo de atuação no processo inflamatório, tal como sobre a fosfolipase A₂(PLA₂), realizou-se o teste da dermatite de orelha induzida pelo óleo de cróton.

Este teste se baseia na aplicação tópica de óleo de cróton nas orelhas de camundongos. O óleo de cróton é constituído principalmente por TPA (12-O-acetato de tetradecanoilforbol), o qual promove eventos de processos inflamatórios como edema, infiltração e proliferação celular como neutrófilos e polimorfonucleares, com a produção de metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas (FURSTENBERGER et al., 1981; STANLEY et al., 1991). Por este motivo, este teste é muito utilizado em pesquisa na avaliação de fármacos anti-inflamatórios esteroideal (TUBARO et al., 1986).

Estudos indicam que os ésteres de forbol do TPA atuam na ativação da proteína quinase C (PKC), que ao aumentar a atividade da PLA₂, induz a formação da cascata do ácido araquidônico levando ao aumento da expressão de ciclooxigenase e lipooxigenase e, consequentemente, aumentando a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (FURSTENBERGER et al., 1981; NEMENOFF et al., 1993; MARKS e GSCHWENDT 1995). O TPA também aumenta a expressão de TNF- α , IL1- β e da molécula de adesão ICAM-1 seguido da migração celular (JANG e PEZZUTO, 1998, CHI et al., 2003).

De acordo com os resultados obtidos, após 1h do tratamento a FAOC (98 mg/kg) e a FAOC-HDL (222,9 mg/kg), reduziram significativamente em respectivamente 25,59% e

47,65% o desenvolvimento do edema das orelhas dos animais, o mesmo não foi encontrado no tratamento com HDL (222,9 mg/kg) (Figura 10 A). Como a FAOC não obteve um efeito tão expressivo na redução do desenvolvimento do edema de orelha, quando comparado com a FAOC-HDL, sugere-se que esta última possivelmente obteve maior inibição da ativação da PKC e consequentemente a redução da atividade da PLA₂. Como resultado, redução de ativação do ácido araquidônico e da síntese de prostaglandinas e leucotrienos.

No teste da dermatite, o tratamento com a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) mostrou efeito semelhante ao controle positivo Dexametasona (1 mg/kg), visto que não houve uma diferença significativa entre os dois tratamentos (Figura 10 A).

A ação antiedematogênica do óleo de copaíba, avaliada sobre esse teste, foi descrita em estudos prévios (CARVALHO et al., 2005, VIRIATO et al 2009). Entretanto, nossos resultados demonstram que FAOC (98 mg/kg), bem como, a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) obtiveram resultados mais expressivos com dose menor que os descritos nesses trabalhos onde foram usadas as doses de 517 mg/kg, 1035 mg/kg e 1802 mg/kg.

Também houve redução significativa da dermatite de orelha no tratamento oral com FAOC-HDL (222,9 mg/kg) em 57,05%, realizado 24h antes do teste (Figura 10 B). Isto indica que até esse período ocorre uma inibição da atividade da PLA₂, bem como na redução na expressão de TNF- α , IL1- β e da molécula de adesão ICAM-1, ocasionado pela efeito prolongado da FAOC-HDL (222,9 mg/kg).

Posteriormente, o edema também foi induzido por outro agente inflamatório, a carragenina. A carragenina é um polissacarídeo derivado de extrato de algas da espécie *Chondrus crispus* (WINTER et al., 1962; DI ROSA, 1972) que estimula a liberação de TNF- α , NO, IL-6, IL-1 β e IL-8 que são importantes nas respostas nociceptivas, contribuindo com a hiperalgesia, além disso as citocinas liberadas induzem a migração das células de defesa tais como os leucócitos para o tecido (CUNHA et al., 1992; TONUSSI e FERREIRA, 1999; KATAOKA et al., 2012).

O teste de edema de pata induzido pela carragenina é um modelo de inflamação, na qual estimula mediadores químicos causando um desenvolvimento do edema, durante 5 horas, em intervalos a cada 1 hora (WINTER et al, 1962).

Na primeira hora, são estimulados mediadores químicos como histamina, serotonina, na segunda hora ocorre o estímulo de bradicinina, ambos são responsáveis pela hiperalgesia, permeabilidade vascular e dilatação arteriolar. Na terceira hora do desenvolvimento do

edema, é observada a participação das prostaglandinas no processo inflamatório. Na quarta e quinta hora ocorre a formação de um exsudato celular composto principalmente de células polimorfonucleares e seguida das células mononucleares (VINEGAR et al., 1969; DI ROSA et al., 1971; DI ROSA, 1972).

O teste de edema de pata é um teste que consiste em avaliar possíveis agentes anti-inflamatórios não esteroidais (DI ROSA et al., 1971), diferentemente do teste de dermatite de orelha, cujo mecanismo permite avaliar a ação sobre a atividade da PLA_2 (FURSTENBERGER et al., 1981).

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento oral com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) 1h antes do estímulo flogístico, reduziu significativamente o desenvolvimento do edema na 2ª e 3ª hora, o mesmo foi observado no tratamento com o controle Indometacina (5 mg/kg) (Figura 11 A).

Não houve diferença nos tratamentos com FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) e Indometacina (5 mg/kg), no desenvolvimento do edema na 2ª e 3ª hora, logo ambos apresentaram similar efeito nesse teste. Ao reduzir significativamente o desenvolvimento na 2ª e 3ª hora, sugere-se que ambos exerceram ação frente a síntese ou bloqueios dos receptores de bradicinina e prostaglandinas.

Este dado difere de Carvalho et al., (2005) que observou uma redução significativa no desenvolvimento do edema na 1ª, 2ª e 4ª hora, do óleo bruto da espécie *Copaifera duckei* Dwyer, com a dose de 1802 mg/kg. Essa diferença entre os nossos resultados pode ser devida a dose testada, bem como, pode ser atribuída aos constituintes químicos envolvidos, pois no óleo bruto estão presentes também sesquiterpenos hidrogenados e sesquiterpenos oxigenados.

A FAOC-HDL (222,9 mg/kg) também reduziu o edema de pata na terceira hora no período de 24h após o tratamento em 30,28% (Figura 11, B), sugerindo assim, efeito prolongado da FAOC-HDL (222,9 mg/kg) até esse período de tempo, através da redução da síntese de prostaglandinas ou bloqueios dos seus receptores EP_2 e IP.

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a migração celular, foi realizado o teste da peritonite induzida por carragenina.

Neste modelo a carragenina atua através do estímulo de $TNF-\alpha$, NO, IL-6, IL-1 β e IL-8 que são importantes nas respostas nociceptivas, contribuindo com a hiperalgesia, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, as citocinas liberadas nesse teste

induzem a migração das células de defesa tais como os leucócitos polimorfonucleares e mononucleares para o tecido (DI ROSA, 1972; CUNHA et al., 1992; TONUSSI e FERREIRA, 1999; KATAOKA et al., 2012).

Assim, neste modelo de inflamação, ocorre a migração leucocitária ocasionada pelo estímulo químico através da injeção de carragenina. É observada a migração de células da corrente sanguínea para a cavidade peritoneal, principalmente de neutrófilos que são as primeiras células envolvidas na defesa contra patógenos, e apresentam um mecanismo capaz de capturar e matar patógenos (BRINKMANN et al., 2004; BARTH et al., 2016).

O tratamento com a FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) reduziu significativamente a migração dos leucócitos totais, assim como no tratamento com controle positivo Dexametasona (1 mg/kg). Este efeito não foi observado no tratamento com HDL (222,9 mg/kg) (Figura 12 A). Em relação ao efeito dos tratamentos, não foi observado diferença estatística entre os tratamentos com FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) e Dexametasona (1 mg/kg) (Figura 12 A).

A migração de neutrófilos após 1h de tratamento com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) foi reduzida significativamente, bem como no tratamento com o controle positivo com Dexametasona (1 mg/kg) (Figura 13 A). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com FAOC (98 mg/kg), FAOC-HDL (222,9 mg/kg) e Dexametasona (1 mg/kg). Não foi observada essa redução na migração dos neutrófilos no tratamento com HDL (222,9 mg/kg) após 1h de tratamento (Figura 13 A).

Assim sugere-se que o tratamento com FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) foi capaz de reduzir a secreção das citocinas pró-inflamatórias das células locais, visto que estimulam moléculas de adesão como selectina E e ICAM-1 que atuam no processo de recrutamento dos leucócitos como os neutrófilos (interação com o endotélio) nas etapas de rolamento, adesão, transmigração e quimiotaxia (LEY et al., 2007).

Esse resultado é semelhante ao encontrado em estudos com modelos *in vitro* com óleo de copaíba onde demonstraram uma redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β (GELMINI et al., 2013). Ainda não foi realizada a investigação da migração celular em modelos *in vivo* com óleo de copaíba.

Não foi observada uma redução significativa na migração das células mononucleares (linfócitos e monócitos) com nenhum dos tratamentos 1h e 24 após os tratamentos (Figura 14 A e B), uma vez que essas células predominam na fase crônica ou tardia das reações

inflamatórias, visto que são células de baixa locomoção (CHI e PAMER, 2011; ARTIS e SPITS, 2015). Também foi observado no estudo de BARTH et al., (2016), que a carragenina não induz significativamente a proliferação de células mononucleares.

Diferentemente do que foi observado após 1h do tratamento, não foi observado efeito significativo na redução da migração dos leucócitos totais e neutrófilos após 24h do tratamento com FAOC-HDL (222,9 mg/kg) (Figura 12 B e Figura 13 B). Sugerindo que a fração ácida intercalada em HDL, não obteve efeito sobre a secreção das citocinas pró-inflamatórias nesse período, não reduzindo assim, a migração das células para a cavidade peritoneal.

Desta forma, o conjunto de resultados permitem concluir que a FAOC (98 mg/kg) e FAOC-HDL (222,9 mg/kg) apresentaram atividade antinociceptiva periférica, isto é, apresentam uma redução ou bloqueio dos receptores de histamina, bradicinina e prostaglandinas. Estes efeitos foram observados sobre a redução do número de contorções abdominais, no teste de contorção abdominal induzido pelo ácido acético 0,6%, e redução do tempo de lambida da pata, na segunda fase do teste da formalina.

Com relação à atividade anti-inflamatória, a FAOC (98 mg/kg) e a FAOC-HDL (222,9 mg/kg) atuou significativamente sobre os principais eventos da inflamação, através da inibição do edema, da redução da migração celular. Este efeito é importante para o tratamento da inflamação e redução dos eventos ocasionados pela inflamação como dor, rubor e febre, contribuindo para a homeostase do organismo. Estes resultados foram observados, nos testes de dermatite de orelha, edema de pata induzido por carragenina, bem como, na peritonite induzida por carragenina.

As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da FAOC podem ser atribuídas aos diterpenos presentes nessa fração, entre os quais estão os ácidos hardwíckiiico, covalenico e o ácido copálico que é considerado o ácido majoritário presente nessa fração (GOMES et al., 2008; GOMES et al., 2010).

A intercalação em HDL mostrou-se satisfatória onde houve um efeito prolongado de um produto natural (fração ácida do óleo de copaíba) para o tratamento da dor e inflamação, como observado em pesquisas anteriores com fármacos anti-inflamatórios intercalados (ZHANG et al., 2014).

No mercado atual já existem fármacos com liberação controlada como nifedipino (anti-hipertensivo), onde é usada uma matrix de hidroxipropilmetilcelulose e cetoprofeno (anti-

inflamatório) associada a matrix de hidroxietilcelulose que libera de maneira progressiva o fármaco (BADU et al., 2010; MACOCINSCHI et al., 2012). No entanto a liberação controlada por essas matrizes são diferentes da liberação pelo HDL.

Como foi observada, a intercalação da FAOC em HDL apresentou efeito até 24h após o tratamento em modelo *in vivo*. Não foi observado efeito após 48h após o tratamento, ou seja, provavelmente nesse período já deve ter ocorrido a total liberação da FAOC para a circulação sistêmica.

Então, como foi demonstrado, a liberação prolongada é importante para fornecer uma concentração terapêutica necessária para alcançar e manter a atividade farmacológica, ou seja, é uma forma farmacêutica vantajosa, auto administrável que permite a liberação constante do fármaco, bem como, de um produto natural. Assim, a intercalação da FAOC em HDL também foi importante, para fortalecer um produto natural já bastante utilizado na região amazônica. Com isso, as perspectivas futuras serão elucidar os mecanismos de ação aqui sugeridos, e também avaliar a atividade toxicológica da FAOC e FAOC-HDL.

Logo, esta pesquisa se destaca por valorizar o potencial farmacológico da região amazônica, ao utilizar um produto natural importante terapeuticamente para a região, e acrescenta inovação tecnológica através do nanocarreamento de fármacos. Desta forma, almeja-se que a informação obtida possa contribuir para o estudo de uma alternativa para o tratamento da dor e inflamação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a FAOC (98 mg/kg) possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*.

A intercalação da FAOC em HDL, avaliada através da FAOC-HDL (222,9 mg/kg), também apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Especialmente, a FAOC-HDL foi capaz de exercer este efeito até 24h após o tratamento, demonstrando sustentação do efeito farmacológico resultante da intercalação da FAOC em HDL.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI-HASANI, R. e BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2011.
- ALLEN, T.M. e CULLIS, P.R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, p. 1818-1822, 2004.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.
- AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents. Intercalation and *in vitro* release of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, n. 2, p. 23-32, 2001.
- AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; NOCCHETTI, M.; PERIOLI, L. Effect of hydrotalcite-like compounds on the aqueous solubility of some poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 1407–1418, 2003.
- ANKIER S.I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 27, p. 1–4, 1974.
- ARTIS, D. e SPITS, H. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, p. 293 – 301, 2015.
- BABU, V.R.; KANTH, V.R.; MUKUND, J.M.; AMINABHAVI, T.M. Novel Methyl Cellulose-Grafted-Acrylamide/Gelatin Microspheres for Controlled Release of Nifedipine. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, p. 3542–3549, 2010.
- BARTH, C.R.; FUNCHAL, G.A.; LUFT, C; DE OLIVEIRA, J.R.; PORTO, B.N.; DONADIO, M.V.F. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European Journal of Immunology**, v. 46, p. 964–970, 2016.
- BARTON, G. M.; A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n.2, p. 267-284, 2009.
- BASIL, M. C. e LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 16, p. 51-67, 2016.

- BERGER, M.; GRAY, J.A.; ROTH, B.L. The expanded biology of serotonin. **Annual Review Med**, v. 60, p. 355–366, 2009.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610–1615, 1999.
- BI, X.; ZHANG, H.; DOU, L. Layered double hydroxide-based nanocarriers for drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 6, p. 298–332, 2014.
- BOEHME, S.A.; LIO, F.M.; SIKORA, L.; PANDIT, T.S.; LAVRADOR, K.; RAO, S.P.; SRIRAMARAO, P. Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 3599–3603, 2004.
- BOTTING, R. e AYOUB, S.S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85–87, 2005.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.
- BUSHNELL, M. C.; ČEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 502–511, 2013.
- CAO, F.; WANG, Y.; PING, Q.; LIAO, Z. Zn–Al–NO₃-layered double hydroxides with intercalated diclofenac for ocular delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404 p. 250–256, 2011.
- 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, p. 946–950, 2005.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p.773-778, 2000.
- 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**. v. 99, p. 13926–13931, 2002.
- CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** v. 104, p. 58–66, 2013.

CHI, Y.S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271–1278, 2003.

COELHO, A.C.V. e SANTOS, P.S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas – Uma revisão. **Química Nova**, v. 30, p. 1282-1294, 2007b.

COELHO, A.C.V. e SANTOS, P.S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Química Nova**, v. 30, p. 146-152, 2007a.

COLLIER, H. O. J.; 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, p. 295-310, 1968.

CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery**, v. 182, p. 558–562, 2001.

CORREA, C. R.; KYLE, D. J.; CHAKRAVERTY, S.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 552-558, 1996.

COSTIGAN, M. e WOOLF C.J. Pain: molecular mechanisms. **Journal of Pain**, v. 1, p. 35-44, 2000.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annul Review Neuroscience**. v. 32, p.1–32, 2009.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T.M.; VERRI JÚNIOR, 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**, v. 102. n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, V.R.R.; GUILHERME, V.A.; PAULA, E.; ARAUJO, D.R.; SILVA, R.O.; MEDEIROS, J.V.R.; LEITE, J.R.S.A.; PETERSEN, P.A.D.; FOLDVARI, M.; PETRILLI, H.M.; CONSTANTINO, V.R.L. Delivery system for mefenamic acid based on the nanocarrier layered double hydroxide: Physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **Materials Science and Engineering C**, v. 58 p. 629–638, 2016.

CURIEL, R.V. e KATZ, J.D. Mitigating the Cardiovascular and Renal Effects of NSAIDs. **Pain Medicine**, v. 14, p. S23–S28, 2013.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N.S.; DI PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P.K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, p. 79–93, 2004.

DEL ARCO, M.; CEBADERA, E.; GUTIÉRREZ, MARTÍN, S.C.; MONTERO, M.J.; RIVES, V. ROCHA, J.; SEVILLA, M.A. Mg,Al Layered Double Hydroxides with Intercalated Indomethacin: Synthesis, characterization, and pharmacological study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 6, p. 1649–1658, 2004.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-28, 1971.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8-16, 2008.

ERTEKIN, Z.C.; BAYINDIR, Z.S.; YUKSEL, N. Stability Studies on Piroxicam Encapsulated Niosomes. **Current Drug Delivery**, v. 12, n. 2, p. 1992-1999, 2015.

FARQUHAR-SMITH, W.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine Pain**, v.9, p. 3–7, 2008.

FURSTENBERGER, G.; RICHTER, H.; FUSENIG, N.E.; MARKS F. Arachidonic acid and prostaglandin E₂ release and enhanced cell proliferation induced by the phorbol ester tpa in a murine epidermal cell line. **Cancer Letters**, v. 11, p. 191-198, 1981.

FRUTOS G. e DE VILLA R.M. Nonlinear mixed-effects model for the dissolution assays of drugs. **Journal of Controlled Release**, v.94, p.381-389, 2004.

- FULLERTON, J.N. e GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p.1871-1875, 2001.
- GAJRAJ, N.M. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone healing. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, n. 5, p. 456–465, 2003.
- GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p.1249–1257, 2008.
- GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M. MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A. FACINO, R.M. 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, p. 170-178, 2013.
- GOETTL, V. M. e LARSON, A. A. An antagonist of substance P N-terminal fragments, D-substance P (1–7), reveals that both nociceptive and antinociceptive effects are induced by substance P N-terminal activity during noxious chemical stimulation. **Brain Research**, v. 780, p. 80–85, 1998.
- GOMES, M.C.; REZENDE M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.177–183, 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, p. 486–492, 2007.
- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; HOVELL, A.M.C.; LANDGRAF, R.G.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 179–184, 2008.
- GONZALEZ-BURGOS, E. ; GOMEZ-SERRANILLOS, M.P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.31, p.5319-5341, 2012.

GORDIJO, C.R.; BARBOSA, C.A.S.; FERREIRA, A.M.C.; CONSTANTINO, V.R.L.; SILVA, D.O. Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 1135–1148, 2005.

GU, Z.; WU, A.; LI, L.; XU, Z.P. Influence of hydrothermal treatment on physicochemical properties and drug release of anti-Inflammatory drugs of intercalated layered double hydroxide nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 6, p. 235-248, 2014.

GUNDUZ, O.; AHMAD, Z.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Continuous Generation of Ethyl Cellulose Drug Delivery Nanocarriers from Microbubbles. **Pharmaceutical Research**, v.30, p. 225–237, 2013.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 821 - 847, 2013.

HEINRICHERA, M.M.; TAVARESC, I.; LEITHE, J.L.; LUM, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain research reviews**, p. 214-225, 2009.

HILÁRIO; M.O.E.; TERRERIII; M.T. LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 206-212, 2006.

HUNSKAAR, S. e HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–114, 1987.

HUSSEY, M. J.; CLARKE, G. D.; LEDENT, C.; HOURANI, S. M.O.; KITCHEN, I. Reduced response to the formalin test and lowered spinal NMDA glutamate receptor binding in adenosine A2A receptor knockout mice. **Pain**, v.129, p. 287–294, 2007.

HWANG, S.H.; WECKSLER, A.T.; WAGNER, K.; HAMMOCK, B.D. Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1783–1799, 2013.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Terpenes from *copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2994–3001, 2012.

JAMZAD, S. e FASSIHI, R. Development of a controlled release low dose class III drug glipizide. **International Journal of Pharmaceutics**, v.312, p.24-32, 2006.

JANG, M.; e PEZZUTO J.M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateinduced oxidative events and gene expression in mouse skin. **Cancer Letters**, v.134, p. 81-89, 1998.

JAUBERTIE, C.; HOLGADO, M.J.; SAN ROMÁN, M.S.; RIVES, V. Structural characterisation and delamination of lactate-intercalated Zn, Al-layered double hydroxides. **Chemistry of Materials**. v. 18, p. 3114–3121, 2006.

JONES, R.; RUBIN, G.; BERENBAUM, F.; SCHEIMAN, J. Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 6, p. 464-474, 2008.

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

KATAOKA, T.; TERAOKA, J.; SAKODA, A.; NISHIYAMA, Y.; YAMATO, K.; MONDEN, M.; ISHIMORI, Y.; NOMURA, T.; TAGUCHI, T.; YAMAOKA, K. Protective Effects of Radon Inhalation on Carrageenan-Induced Inflammatory Paw Edema in Mice. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 713-722, 2012.

KAWAHARA, K.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, 414-421, 2015.

KIM, T.H.; LEE, G.J.; KANG, J.H.; KIM, H.J.; KIM, T.I.; OH, J.M. Anticancer drug incorporated layered double hydroxide nanohybrids and their enhanced anticancer therapeutic efficacy in combination cancer treatment. **Biomedicine Research International**, v. 2014, p. 1-14. 2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE-BEER E.J. Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p. 412-420, 1959.

KUTHATI, Y.; KANKALA, R.K.; LEE, C-H. Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects. **Applied Clay Science**, v. 112, p. 100-116, 2015.

LAMA, R.; ZHONG B.; KULMAN, D. G.; SU, B. Bioassay guided identification of small chaperone proteins a-crystallin and Hsp27 inhibitors from Copaiba oil. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 65-75, 2014.

- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.
- LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.
- LI, B.X.; HE, J.; EVANS, D.G.; DUAN, X. Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system—Intercalation and in vitro release of fenbufen. **Applied Clay Science**, v. 27, p. 199–207, 2004.
- LIU, Y. e NAIR M.G. Labdane diterpenes in Curcuma mangga rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 124, p. 527–532, 2011.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACOCINSCHI, D.; FILIPA, D.; VLADA, S.; OPREA, A.M.; GAFITANU C.A. Characterization of a poly(ether urethane)-based controlled release membrane system for delivery of ketoprofen. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 416–423, 2012.
- MARKS, F. e GSCHWENDT, M. Protein kinase C and skin tumor promotion. **Mutation Research**, v. 333, p. 161-172, 1995.
- MARKS, D. M.; SHAH, M. J.; PATKAR, A. A.; MASAND, P. S.; PARK, G.-Y.; PAE, C.-U. Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors for Pain Control: Premise and Promise. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 331-336, 2009.
- MARTELL, M.; COLL, M.; EZKURDIA, N.; RAURELL, I. E GENESCÀ, J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. **World Journal of Hepatology**, v. 2, p. 208–220, 2010.
- MASON, P. Deconstructing endogenous pain modulation. **Journal of Neurophysiology**, v. 94, p. 1659-1663, 2005.
- MATSUMOTO, H.; NARABA, H.; UENO, A.; FUJIYOSHI, T.; MURAKAMI, M.; KUDO, I.; OH-ISHI, S. Induction of cyclooxygenase-2 causes an enhancement of writhing response in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 352, p. 47–52, 1998.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

- MELNIKOVA, I. Future of COX 2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 4, p. 453-454, 2005.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MONDAL, S.; DASGUPTA, S.; MAJI, KANCHAN. MgAl- Layered Double Hydroxide Nanoparticles for controlled release of Salicylate. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 557–564, 2016.
- MONTUSHI, P.; SALA, A.; DALHÉN, S-E.; FOLCO, G. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug Discover Today**. v. 12, p. 404-412, 2007.
- MOORE, P.K. e HOULT, J.R.S. Anti-inflammatory steroids reduce tissue PG synthetase activity and enhance PG breakdown. **Nature**, v. 288, p. 269 – 270, 1980.
- NAKANO, T. e DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 26, p. 167–173, 1961.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846–852, 2002.
- NEMENOFF, R.A.; WINITZ, S.; QIAN, N-X.; PUTTEN, V.V.; JOHNSON, G.L.; HEASLEY, L.E. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A₂ by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1960-1964,1993.
- NEWMAN, S.P.; JONES, W. Synthesis, characterization and applications of layered double hydroxides containing organic guests. **New Journal of Chemistry**. v. 22, 105–115, 1998.
- OBEROI, H.S. NUKOLOVA, N.V. KABANOV, A.V. BRONICH, T.K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 1667-1685, 2013.
- OH, J-M.; PARK, D-H.; CHOI, S-J.; CHOY, J-H. LDH Nanocontainers as Bio-Reservoirs and Drug Delivery Carriers. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 6, n.3, p. 200-217, 2012.
- OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253–259, 2005.
- PAINE, D.N.R. e ADCOCK, I.M. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 2, p. 145-150, 2000.

- PAIVA, L.B. e DE MORALES, A.R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 136-140, 2006.
- PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; DÍAZ, F.R.V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v. 54 p. 213-226, 2008.
- PARENTE, L. e PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenase: two enzymes in the spotlight. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 153-159, 2003.
- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 465-472, 2009.
- PINTO, A.C., BRAGA, W.F., REZENDE, C.M., GARRIDO, F.M.S., VEIGA V.F.JR., 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, p. 355–360, 2000.
- POBER, J.S. e SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803–815, 2007.
- QUEIROZ, L.M.D.; ROCHA, J.R.; LEITÃO, A. MONTANARI, C.A.; DA SILVA, A.B.F.; SOUSA, P.J.C.; BORGES, R.S. A combined study using ligand-based design, synthesis, and pharmacological evaluation of analogues of the acetaminophen ortho-regioisomer with potent analgesic activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, p. 99-105, 2012.
- RABER, J. Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 735-741, 2007.
- 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 p. 111–118, 2000.
- RICCIOTTI, E. e FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, p. 986–1000, 2011.

- RIVES, V.; DEL ARCO M.; MARTÍN, C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. **Journal of Controlled Release**, v. 169, p. 28–39, 2013.
- ROSLAND, J. H.; TJØLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42 p. 235-242, 1990.
- SANTILLI, C. V.; CHIAVACCI, L. A.; LOPES, L.; PULCINELLI, S. H.; OLIVEIRA, A.G. Controlled drug release from ureasil-polyether hybrid materials. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 463-467, 2009.
- SARTORELLI, P.; CARVALHO, C.S.; REIMÃO, J.Q.; LORENZI, H.; TEMPONE, A.G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*.. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v.76, p. 1454-1456, 2010.
- SAYERS, R. D., Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 84, 239-246, 2002.
- SENAPATI, S.; THAKUR, R.; PRAKASH, V.S.; DUGGAL, S.; MISHRA, D.P.; DAS, P.; SHRIPATHI, T.; KUMAR, M.; RANA, D.; MAITI, P. Layered double hydroxides as effective carrier for anticancer drugs and tailoring of release rate through interlayer anions. **Journal of Controlled Release**, v. 224, p. 186–198, 2016.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T. TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38 p. 347-352, 1989.
- SIMMONS, D.L.; WAGNER, D.; WESTOVER, K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 211-218, 2000.
- SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 387-437, 2004.
- SIMON, L.S. Role and Regulation of Cyclooxygenase-2 During Inflammation. **American Journal of Medicine**, v.106, n.5B, p.37-42, 1999.
- SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.G.; SOUZA, M.G.M.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; 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, p. 215–220, 2011a.

SOUZA, A.B.; SOUZA, M.G.; MOREIRA, M.A.; MOREIRA, M.R.; FURTADO, N.A.; MARTINS, C.H.; BASTOS, J.K.; SANTOS, R.A.; HELENO, V.C.; AMBROSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, p. 9611–9619, 2011b.

SOUZA, G.E. e FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97–103, 1985.

STANLEY, P.L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSCH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 4, n. 4, p. 262-271.1991.

STEWART, M.K. e COOKSON, B.T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspasedependent inflammatory responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 346-359, 2016.

TANG, H-B.; LI, Y-S.; ARIHIRO, K.; NAKATA, Y. Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. **Molecular Pain**, v. 3, p. 1-10, 2007.

TEIXEIRA-NETO, É. e TEIXEIRA-NETO, Â.A. Modificação química de argilas: desafios científicos e Tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova**, v. 32, p. 809-817, 2009.

TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor- α mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, v. 82, p. 81–87, 1999.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v, 420, p. 853-859, 2002.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA, L.R. The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, v. 17, p. 347–349, 1985.

ÚRZUA, A.; JARA, F.; TOJO, E.; WILKENS, M.; MENDONZA, L.; REZENDE, M.C. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinuos exudative of *Haplopappus uncinatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p.297–301, 2006.

VARDEH, D.; MANNION, R.J.; WOOLF, C.J. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 9, p. T50-T69, 2016.

VEIGA JÚNIOR 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 cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112 p.248–254, 2007.
- VEIGA JÚNIOR, V.F. e PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VERMEIRSCH, H. e MEERT, T. F. Morphine-Induced Analgesia in the Hot-Plate Test: Comparison between NMRInu/nu and NMRI mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 94, p. 59–64, 2004.
- VERRI JÚNIOR, W. A.; CUNHA, T. M. PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q. FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p. 116–138, 2006.
- VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969.
- WALNNER, B.P.; MATALLIANO, R.J.; HESSION, C.; CATE, R.L.; TIZARD, R.; SINCLAIR, L.K.; FOELLER, C.; CHOW, E.P.; BROWNING, J.L.; RAMACHANDRAN, K.L.; PEPINSKY, R.B. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A₂ inhibitor with potential anti-inflammatory activity. **Nature**, v. 320, p. 77-81, 1986.
- WANG, H.; WESTIN, L.; NONG, Y.; BIRNBAUM, S.; BENDOR, J.; BRISMAR, H.; NESTLER, E.; APERIA, A.; FLAJOLET, M.; GREENGARD, P. Norbin is an endogenous regulator of metabotropic glutamate receptor 5 signaling. **Science**, v. 326, p. 1554-1557, 2009.
- WHITE, J.P.M.; CIBELLI, M., FIDALGO, A.R.; PAULE, C.C.; NOORMOHAMED, F.; URBAN L.; MAZE, M.; NAGY, I. Role of Transient Receptor Potential and Acid-sensing Ion Channels in Peripheral Inflammatory Pain. **Anesthesiology**. v. 112, p. 729–741, 2010.
- WILTING, J.; BECKER, J.; BUTTLER, K.; WEICH, H.A. Lymphatics and Inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4581-4592, 2009.
- WINTER, C.A. RISLEY, E. A. NUS G.W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111 p. 544-547, 1962.
- WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**. v.120, n. 11, p. 3742–3744, 2010.

WOOLF, C.J. e SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p: 1765-1769, 2000.

WOOLF, C.J. e MA, Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-64, 2007.

ZHANG, J-M. e AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27–37, 2007.

ZHANG, K.; XU, Z.P.; LU, J.; TANG, Z.Y.; ZHAO, H.J.; GOOD, D.A.; WEI, M.Q. Potential for layered double hydroxides-based, innovative drug delivery systems. **International Journal Molecular Scienses**, v. 15, p. 7409–7428, 2014.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÁCIDO COPÁLICO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS.", protocolado sob o CEUA nº 6776250816, sob a responsabilidade de **Luana Melo Diogo De Queiroz e equipe; Cláudio Nahum Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 29/09/2016.

We certify that the proposal "PLANNING, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF ACID COPALIC IN DRUG CONTROLLED RELEASE SYSTEM.", utilizing 162 Heterogenics mice (162 males), protocol number CEUA 6776250816, under the responsibility of **Luana Melo Diogo De Queiroz and team; Cláudio Nahum Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 09/29/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 09/2018

Área: Faculdade De Farmácia

Procedência: Biotério FACFAR

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 45 a 60 dias N: 162

Linhagem: *Mus musculus*

Peso: 25 a 35 g

Resumo: Uma importante fonte para a obtenção de novos fármacos é através dos produtos naturais. Dentre eles, as espécies vegetais se destacam no fornecimento de princípios ativos à medicina e, a região amazônica é considerada a maior detentora de biodiversidade do planeta. Nesse sentido, um produto natural de grande importância pelo seu potencial farmacológico é o óleo de copaíba, uma oleoresina obtida a partir da *Copaifera L.* gênero (Leguminosaeae), muito utilizado pela população amazônica como anti-inflamatório. Entre seus constituintes químicos, destaca-se o ácido copálico, um diterpeno considerado biomarcador presente na oleoresina de várias espécies de *Copaifera*. Estudos *in vitro* indicam que o ácido copálico possui diversas atividades farmacológicas como: bactericida, anticancerígena, e inibição da enzima ciclooxigenase, sugerindo também a atividade anti-inflamatória. Associada a essa investigação por fármacos com efeitos colaterais menos acentuados, existe uma crescente busca por formas de administração que também visem diminuí-los. Dessa maneira, é crescente o interesse da utilização de materiais nanoestruturados como exemplo, hidróxidos duplos lamelares (HDLs), que são materiais inorgânicos biodegradáveis potencialmente usados como sistemas de liberação de fármacos. Estes podem possibilitar a redução da toxicidade, aumento da eficácia, diminuição da dose e a liberação sustentada de fármacos. Desta forma, a expectativa deste projeto é identificar a propriedade antinociceptiva do ácido copálico *in vivo*, e avaliar este efeito em sistema de liberação controlada, pela sua intercalação em HDLs. Assim, almeja-se contribuir cientificamente na busca por novos fármacos que possam ser mais seguros e de igual, ou melhor, eficácia terapêutica.

Belém do Pará, 29 de setembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória do ácido copálico, intercalado em nanocarreadores de hidróxidos duplos lamelares, para sistemas de liberação controlada de drogas.", protocolado sob o CEUA nº 7535231116, sob a responsabilidade de **Luana Melo Diogo De Queiroz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 20/04/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the antiinflammatory activity of copalic acid, intercalated in lamellar double hydroxide nanochargers, for controlled drug release systems.", utilizing 216 Heterogenics mice (216 males), protocol number CEUA 7535231116, under the responsibility of **Luana Melo Diogo De Queiroz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 04/20/2017.

Vigência da Proposta: de 04/2017 a 04/2019

Área: **Faculdade De Farmácia**

Procedência: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

Gênero: **Machos**

idade: **30 a 45 dias** N: **216**

Linhagem: **Mus musculus**

Peso: **25 a 35 g**

Resumo: Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente consumidos em todo o mundo, devido à frequência com que patologias envolvendo a dor e inflamação afetam os seres humanos. Os efeitos colaterais ocasionados pelos AINEs tais como, distúrbios gastrointestinais e renais, têm motivado o estudo de novas drogas mais seguras para o tratamento da dor e inflamação. Para isso, uma importante fonte para a obtenção de novos fármacos é através dos produtos naturais. Dentre eles, as espécies vegetais se destacam no fornecimento de princípios ativos à medicina e, a região amazônica é considerada a maior detentora de biodiversidade do planeta. Nesse sentido, um produto natural de grande importância pelo seu potencial farmacológico é o óleo de copaiba, uma oleoresina obtida a partir da Copaifera L. gênero (Leguminosae), muito utilizado pela população amazônica como anti-inflamatório. Entre seus constituintes químicos, destaca-se o ácido copálico, um diterpeno considerado biomarcador presente na oleoresina de várias espécies de Copaifera. Estudos in vitro indicam que o ácido copálico possui diversas atividades farmacológicas como: bactericida, anticancerígena, e inibição da enzima ciclooxigenase, sugerindo também a atividade anti-inflamatória. Associada a essa investigação por fármacos com efeitos colaterais menos acentuados, existe uma crescente busca por formas de administração que também visem diminuir os. Dessa maneira, é crescente o interesse da utilização de materiais nanoestruturados como exemplo, hidróxidos duplos lamelares (HDLs), que são materiais inorgânicos biodegradáveis potencialmente usados como sistemas de liberação de fármacos. Estes podem possibilitar a redução da toxicidade, aumento da eficácia, diminuição da dose e a liberação sustentada de fármacos. Desta forma, a expectativa deste projeto é identificar a propriedade anti-inflamatória do ácido copálico in vivo, e avaliar estes efeitos em sistemas de liberação controlada pela sua intercalação em HDLs. Assim, almeja-se contribuir cientificamente na busca por novos fármacos que possam ser mais seguros e de igual, ou melhor, eficácia terapêutica.

Belém do Pará, 20 de abril de 2017

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará