

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIA E EDUCAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

PAULA RONSANI FERRO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO EXTRAÍDO DE *Copaifera officinalis*
(Jacq.) L EM CAMUNDONGOS**

CRICIÚMA

2016

PAULA RONSANI FERRO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO EXTRAÍDO DE *Copaifera officinalis*
(Jacq.) L. EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gabriela Trevisan

Coorientadora: M^a. Samira Dal-Toé de Prá

CRICIÚMA

2016

PAULA RONSANI FERRO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO EXTRAÍDO DE *Copaifera officinalis*.
(Jacq.) L. EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Criciúma, 20 de Junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gabriela Trevisan – Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) - (UNESC) - Orientadora

Prof^a. Dr^a Paula Rohr – Doutora em Genética e Biologia Molecular - (UNESC)

Prof^a. Dr^a Flávia Karine Rigo – Doutora em Farmacologia Bioquímica e Molecular -
(UNESC)

Dedico este trabalho a Deus que me deu forças e aos meus pais Andrea Ronsani Ferro e José Ferro Neto, por inúmeras vezes abdicarem de seus sonhos, para realizarem os meus.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pela proteção, fé e força que me foram concedidas para que eu pudesse enfrentar todos os obstáculos encontrados nesta caminhada.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar e sempre me apoiaram, agradeço por todo amor, paciência e compreensão deles.

À Prof^a. Dr^a. Gabriela Trevisan, por toda paciência, todo conhecimento passado, e pela simplicidade de uma pesquisadora de ponta.

À M^a Samira que esteve comigo desde o início da graduação, me ensinando, orientando, aconselhando, aturando, cuidando não somente como profissional, mas como uma verdadeira amiga.

A Prof^a. Dr^a. Flavia por todo apoio, incentivo, ânimo empenhando-se sempre em ajudar e mostrar que devemos acreditar naquilo que fazemos.

Aos colegas e amigos de classe que estiveram presentes durante essa caminhada e dispostos a estender a mão nos momentos de dificuldade.

À todos os professores que passaram por minha vida, plantando uma semente de conhecimento para que hoje eu pudesse estar aqui.

Ao grupo de pesquisa LABIM, que sempre me acolheu e me fez sentir bem no ambiente de trabalho, sendo grandemente grata por todos do grupo.

“Muito, muito grande é o poder que existe nas ervas, plantas, pedras e suas reais virtudes: Pois nenhum ser que na Terra viva é tão vil. Que à Terra um dom especial não de. Dentro da casca nasce dessa flor frágil. O veneno tem moradia e o remédio, força”.

Shakespeare

RESUMO

A dor é um sintoma comum para a procura de serviços de saúde e no caso de pacientes com dor crônica afeta as atividades do cotidiano, convívio social e até a saúde psicológica. Os tratamentos atuais para a dor não apresentam eficácia considerável, principalmente em relação a dor crônica. Então, a busca por novos analgésicos mais efetivos e menos prejudiciais à saúde é constante, principalmente por aqueles que são capazes de bloquear canais iônicos expressos em vias neurais de transdução da dor, como o receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1). Esse receptor pode ser ativado por substâncias irritantes, como a capsaicina (composto presente na pimenta vermelha) e o calor nocivo, acima de 43°C. A planta popularmente conhecida como Copaíba (*Copaifera officinalis*) apresenta descrição popular e científica como anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e analgésica para dores inflamatórias e neuropáticas. Podendo este produto natural ser uma alternativa para a busca de novos tratamentos de patologias dolorosas. Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo de *Copaifera officinalis*, em diferentes modelos de dor aguda e crônica em camundongos, investigando a participação do receptor TRPV1 nestes efeitos. Neste estudo utilizaram-se camundongos Swiss (25-30 g) machos e fêmeas. Inicialmente, para avaliar o efeito do óleo de *Copaifera officinalis* foi utilizado o modelo pré-clínico de dor aguda induzido por exposição ao calor nocivo (48°C), e também o modelo de administração intraplantar de capsaicina (agonista TRPV1). Além disso, o óleo foi também testado no modelo de dor inflamatória causada por administração intraplantar do adjuvante completo de Freund (ACF). Também foram feitas medidas dos efeitos adversos relacionados a locomoção espontânea (teste de campo aberto) ou forçada (teste do cilindro giratório), avaliada a alteração da temperatura corporal dos animais, medida dos níveis séricos de creatinina e ureia, e avaliação do trânsito gastrointestinal e atividade ulcerogênica após a administração do óleo. Observou-se que o óleo de *Copaifera officinalis* causou efeito antinociceptivo no modelo de dor aguda por exposição ao calor e também reduziu o nociceptão e edema no modelo de dor induzida por administração intraplantar de capsaicina. Além disso, o óleo demonstrou efeito anti-alodínico no modelo de dor inflamatória induzida pela administração ACF. Porém não houveram alterações locomotoras ou de temperatura corporal; e também modificações em parâmetros de

lesão renal, ou do trânsito gastrointestinal e indução de danos gástricos. Podemos observar que o óleo de *Copaifera officinalis* apresenta efeito antinociceptivo e não induz efeitos adversos quando administrado de forma aguda, e então poderia ser considerado como uma alternativa para tratamento da dor aguda ou crônica de origem inflamatória. Além disso, estes efeitos antinociceptivos poderiam ser causados por compostos presentes no óleo com ação de antagonistas do canal TRPV1.

Palavras-chave: TRPV1, copaíba, inflamação, analgesia, artrite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático de Receptor de potencial transitório vanilóide 1 ...	14
Figura 2 - Mapa esquemático das regiões com ocorrência do gênero <i>Copaifera</i> ao longo do globo.....	16
Figura 3 - Curva de dose (A) e de tempo (B) para o efeito do óleo de <i>Copaifera officinalis</i> no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico ao calor em camundongos.....	27
Figura 4 - Efeito (A) antinociceptivo e (B) antiedematogênico do óleo de <i>Copaifera officinalis</i> no teste de nocicepção induzida por administração intraplantar de capsaicina em camundongos.....	28
Figura 5 - Avaliação do efeito (A) anti-alodínico do óleo de <i>Copaifera officinalis</i> após a administração de ACF na pata de camundongos. (B) Limiar mecânico observado em camundongos após a administração intraplantar (i.pl.) de PBS (grupo controle).	30
Figura 6 - Avaliação da atividade gastrointestinal (A) e atividade ulcerogênica (B) observada 1 hora após a administração do óleo de <i>Copaifera officinalis</i> (10 mg/kg, via intragástrica, i.g.), Veículo 1% DMSO em 0,9% NaCl, morfina (10 mg/kg) e o SB (3 mg/kg).	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da atividade locomotora.....	31
Tabela 2 – Avaliação da temperatura corporal.....	32
Tabela 3 – Avaliação dos níveis de ureia e creatinina no soro.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.2 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP).....	13
2 OBJETIVO	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS.....	20
3.2 TESTES	21
3.2.1 Teste da retirada da cauda ao estímulo térmico	21
3.2.2 Nociceção espontânea induzida por administração intraplantar de capsaicina	22
3.2.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica, induzido pela administração intraplantar de adjuvante completo de Freund (ACF)	22
3.2.4 Avaliação da atividade locomotora e da temperatura dos animais	23
3.2.7 Atividade ulcerogênica	25
3.2.8 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO DE <i>Copaifera officinalis</i> NO MODELO DE DOR AGUDA CAUSADA PELA EXPOSIÇÃO AO CALOR.....	26
4.2 A ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO DE <i>Copaifera officinalis</i> CAUSOU EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIEDEMATOGÊNICO NO MODELO DE DOR INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA TRPV1.....	27
4.3 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE <i>Copaifera officinalis</i> CAUSOU EFEITO ANTI-ALODÍNICO NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE ACF	29
4.4 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE <i>C. officinallis</i> NÃO PRODUZIU ALTERAÇÕES DETECTÁVEIS NOS TESTES DE LOCOMOÇÃO OU NA TEMPERATURA CORPORAL DOS ANIMAIS.....	30
4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO DE <i>Copaifera officinalis</i> SOBRE PARÂMETROS DE LESÃO RENAL	32

4.6 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE <i>Copaifera officinalis</i> NÃO PROVOCOU ALTERAÇÃO NO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL OU INDUZIU ATIVIDADE ULCEROGÊNICA.....	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO	51
ANEXO – CERTIFICADO DO CEUA	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão”, desta forma envolve processos não somente a transmissão sensorial complexa, conhecida como nocicepção, como também processos emocionais e cognitivos que dependem do paciente (LOESER; TREEDE, 2008). Porém, a dor geralmente trata-se de uma resposta do organismo a agentes nocivos, que possam causar lesão aos tecidos e órgãos (ALMEIDA et al., 2015). Sendo assim, a dor é considerada o quinto sentido mais importante para sobrevivência, pois está relacionada com a proteção do organismo a situações que podem causar dano potencial aos tecidos (DA SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011).

As patologias dolorosas são um dos mais relevantes problemas de saúde que atinge a população, trazendo debilidade ao paciente, envolvendo não somente sua saúde física, mas também psicológica do mesmo (FRANCOIS et al., 2013; KING; FRASER, 2013). Esta sensação acarreta também desgastes físicos e emocionais para os doentes e sua família, junto com grandes fardos econômicos para a sociedade (KING; FRASER, 2013), e devido aos seus vários prejuízos tornou-se a razão mais comum para procura de cuidados de saúde (FRANCOIS et al., 2013; KING; FRASER, 2013; SAULINO; KIM; SHAW, 2014). Desta forma há uma grande relevância nos estudos dos mecanismos envolvidos na dor para promover melhores tratamentos aos pacientes (LOESER; TREEDE, 2008).

Para que haja efetividade nos tratamentos é necessário um conhecimento em detalhes da fisiologia da dor, isso inclui as suas diferentes vias de modulação, mediadores e receptores (ALMEIDA et al., 2015). Destacando a sua transmissão, que envolve a ativação de nociceptores, encontrados na região periférica, por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos (CORTRIGHT; SZALLASI, 2009; JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014). Já a nocicepção deve ser entendida como um termo fisiológico, e tem sido usado para descrever os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008). Este é o parâmetro que se pode avaliar em

modelos animais de dor em ratos e camundongos, pois neste caso não há possibilidade de determinar o componente emocional da dor.

Porém a palavra dor deve ser entendida de três formas diferentes dependendo da sua origem, a dor fisiológica é relevante para a proteção dos tecidos e é classificada como nociceptiva, pois esta forma é gerada pela ativação dos nociceptores, que são terminações sensoriais periféricas que detectam estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009; SARMENTO; WOOLF, 2010; ALEGRE, 2014;). Após a ativação dos nociceptores por estímulos de alto-limiar de origem mecânica, térmica ou química na periferia os neurônios nociceptivos que possuem estas terminações sensoriais transmitem estas informações até a medula espinhal (corno dorsal da medula espinhal), onde ocorrerá a liberação de neurotransmissores excitatórios (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010; SARMENTO; ALEGRE, 2014). Os neurônios nociceptivos possuem seu corpo celular nos gânglios da raiz dorsal para o corpo, e no gânglio trigeminal para a face e pescoço, e apresentam uma terminação periférica (no órgão inervado) e central (na medula espinhal) (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010; SARMENTO; ALEGRE, 2014). No corno dorsal da medula espinhal neurotransmissores como o glutamato e a substância P causam então a ativação de neurônios nociceptivos de segunda ordem que levam a informação nociceptiva até centro supra-espinhais, como o tálamo, córtex somatossensorial, e amígdala (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010; SARMENTO; ALEGRE, 2014).

A dor também pode ser considerada como neuropática quando é gerada por doença ou lesão do sistema somatossensorial periférico ou central, e dessa forma é normalmente considerada crônica e patológica (LUO et al., 2015). A dor também pode ser designada como inflamatória e neste caso é induzida devido a ativação do sistema imune por infecção ou lesão tecidual, onde tem-se a migração de células inflamatórias para o local atingido e produção de mediadores inflamatórios (WOOLF, 2010). Assim, estas moléculas inflamatórias causam a sensibilização dos nociceptores levando a sintomas observados em pacientes com dor inflamatória aguda (dor pós-operatória) ou crônica (artrites), como hiperalgesia, alodínia e dor espontânea (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010). A hiperalgesia deve ser considerada como uma resposta exacerbada do paciente a estímulos que já causavam dor, e a alodínia é entendida como dor a estímulos antes descritos como inócuos (LOESER; TREEDE, 2008).

Diversos canais iônicos expressos na periferia podem modificar as suas atividades devido à interação com mediadores inflamatórios (ACUÑA et al., 2016; LOWIN; PONGRATZ; STRAUB, 2016; SCHAIBLE, 2014). Em todos os casos descritos, com exceção da dor nociceptiva a dor deve ser tratada de forma correta na clínica e dessa forma a busca por novas estratégias de tratamento é relevante, considerando que os fármacos disponíveis para tratamento da dor patológica, ainda apresentam eficácia reduzida e diversos efeitos adversos. Dessa maneira, uma forma de encontrar diferentes tratamentos consiste em avaliar produtos naturais que possam interagir com canais iônicos relevantes para a detecção de estímulos nocivos, como os receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) (ADEBAYO et al., 2015; NGUELEFACK et al., 2015; WANG et al., 2015)

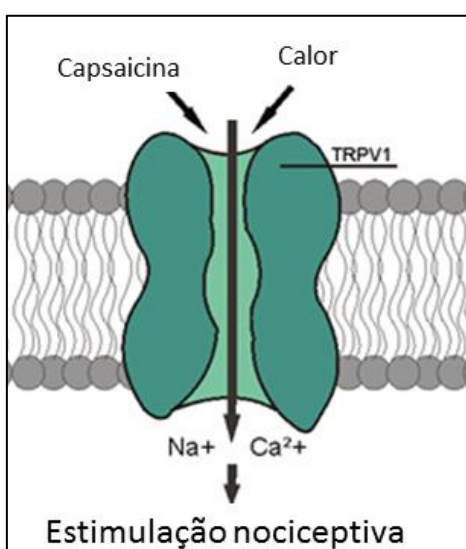
1.2 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)

Os receptores de potencial transitório (TRP) são sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares, fazendo parte dos mecanismos transdução de estímulos dolorosos (MONTELL, 2011). Em mamíferos a família de canais TRP consiste de 28 diferentes proteínas agrupadas em seis famílias de acordo com a sua sequência de aminoácidos e sendo designadas como: TRPV (vanilóide), TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (CLAPHAM, 2003; MONTELL; BIRNBAUMER, 2002; MONTELL, 2005, 2011). Esta classificação também ocorre em famílias e subfamílias, na família dos TRP destacam-se o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) que são canais iônicos não seletivos para cátions, expressos em neurônios sensoriais, sendo que o TRPV1 é um dos mais relevantes para a transdução de estímulos nocivos dentre os seis receptores TRPV já clonados (JULIUS, 2013; MONTELL; BIRNBAUMER, 2002).

O receptor TRPV1 pode ser ativado por diferentes estímulos, denominados como agonistas, eles podem estar presentes em produtos naturais com propriedades pungentes, como a resiniferatoxina (encontrada na planta *Euphorbia resinifera*) e a capsaicina (presente na pimenta vermelha, *Capsicum* sp.). Assim como sua ativação pode se dar por pH abaixo do fisiológico (menor que 6,4) ou substâncias endógenas, como os mediadores inflamatórios: bradicinina, fator de

crescimento neuronal – NGF e trifosfato de adenosina - ATP (JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014). Além disso, o canal TRPV1 (Figura 1) tem também a sua ativação quando exposto ao calor nocivo, acima de 43 °C o que confere a importância deste canal para a proteção do organismo quando da exposição a fontes de calor (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; JULIUS, 2013; MACPHERSON et al., 2007; MCNAMARA et al., 2007; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014; WESSELDIJK et al., 2008).

Figura 1 - Desenho esquemático de Receptor de potencial transitório vanilóide 1 e ativação através da capsaicina (capsaicin), presente na pimenta vermelha e calor (heat) maior que 42 °C.



Fonte: Da autora, 2016.

A identificação de mecanismos que possam sensibilizar ou ativar os receptores TRPV1 é um dos principais objetivos de pesquisas relacionadas à fisiopatologia da dor (HOFFMEISTER et al., 2014; XIA et al., 2011). Visto que, a ativação do receptor TRPV1 pode estar relacionada com mecanismos de desenvolvimento de dor, a descoberta de novos compostos que possam ser ligantes e possíveis antagonistas destes receptores é de grande importância para o desenvolvimento de novos analgésicos relacionados a terapia da dor (JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014).

A aplicação de capsaicina na pata de camundongos ou ratos, ou ainda na pele de humanos causa a liberação de peptídeos inflamatórios no local, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) causando dor

em queimação, edema e vermelhidão no local (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; MITTELSTADT et al., 2012). Estes efeitos indicam que o TRPV1 é um sensor para estímulos nocivos na periferia, e ainda que sua ativação induz reações nociceptivas. Dessa forma, diferentes antagonistas TRPV1 foram testados e mostraram efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática, inflamatória e do câncer (JARA-OSGUERA; SIMON; ROSENBAUM, 2008; JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014). Porém, quando testados em humanos compostos com este mecanismo de ação causaram um efeito adverso de hipertermia, que dessa forma impediu a entrada de muitos antagonistas no mercado (GAVVA et al., 2008). Entretanto, ainda a busca de novos antagonistas TRPV1 que não apresentem esta reação é interessante (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Como diferentes antagonistas TRPV1 foram identificados de produtos naturais com uso popular para a dor e inflamação, como o espinasterol e o eriodictiol (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012), a procura de novos antagonistas em plantas medicinais é de grande interesse.

1.3 *Copaifera* sp.

As plantas do gênero *Copaifera* em específico a espécie *Copaifera officinalis* (Jacq.) L são da família das Leguminosae – Caesalpinoidae são conhecidas popularmente no Brasil como copaíba, copaibeira ou pau de óleo (NOGUEIRA et al., 2013; VEIGA; PINTO, 2002). Com nome proveniente do tupi “cupa-yba” cujo significado é árvore de depósito, referindo-se ao óleo encontrado em seu interior (PINTO; MADURO, 2003). Em 1760, Jacquin descreveu a primeira *Copaifera*, como *Copaifera officinalis*, mas a árvore não apresentava frutos, então usou o modelo de MarcGrave e Piso, de maneira errônea (VEIGA E PINTO, 2002), Somente dois anos mais tarde, Cad von Linnaeus descreveu de forma correta a *Copaifera officinalis*, e então o gênero recebeu a descrição oficial do gênero *Copaifera* L. (LLOYD, 1898).

As espécies de copaíbas são adaptadas a diversos climas do Brasil, primordialmente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, também sendo comuns à América Latina e África Ocidental (Figura 2). Apresentam como características uma copa densa, casca lisa e fuste reto, chegando a viver até 400 anos (MENDONÇA; ONOFRE, 2009; NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008). Entre as

espécies mais encontradas na América do Sul estão a *Copaifera officinalis* em maior abundância no Norte do Amazonas, Roraima, Colômbia e Venezuela, a *Copaifera guianensis* frequente nas Guianas, *Copaifera reticulata*, *Copaifera multijuga* encontradas na Amazônia segundo Wood et.al, 1940.

Figura 2 - Mapa esquemático das regiões com ocorrência do gênero *Copaifera* ao longo do globo.



Fonte: Veiga e Pinto, 2002.

Na figura 2 as regiões em cinzas bem como em preto demonstram a distribuição do gênero *Copaifera* estão distribuídas.

Estas plantas apresentam grande valor ecológico e econômico, difundido em toda América do Sul, por produzirem um óleo com diversas propriedades biológicas em seus canais secretores, presente em todas as partes da árvore, sendo no tronco a maior concentração (NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2007; VEIGA; PINTO, 2002). A utilização do óleo desta árvore na medicina popular se dá como anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, para o tratamento de câncer e na indústria de perfumarias, cosméticos, vernizes e fotografias (VEIGA; PINTO, 2002), já no sistema de defesa, da própria planta, é utilizado para desintoxicação desta, como defesa contra pequenos animais, fungos e bactérias (ALENCAR; ALENCAR, 1988).

Alguns compostos presentes no óleo são responsáveis pelas propriedades medicinais, por meio de análise cromatográfica sabe-se que a resina é composta por sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico, hardwickiico e caurenóico as estruturas mais comuns detectadas por espectrofotometria, responsáveis pelas propriedades medicinais do óleo (NETO; GRAMOSA; SILVEIRA,

2008; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2007; VEIGA; PINTO, 2002). Podendo apresentar uma variância dos componentes do óleo dependendo diretamente espécie e região em que está inserida (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; TAPPIN et al., 2004).

O potencial medicinal do óleo de *Copaifera* sp., assim como diferentes plantas, ganhou importância para a descoberta de alternativas no tratamento e cura de doenças ou na amenização de alguns sintomas (CALIXTO et al., 2005; GOMES et al., 2010; SIXEL; PECINALLI, 2005; SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013). O óleo de *Copaifera* sp. vem sendo utilizado de forma bruta, como um fitoterápico cicatrizante, antimicrobiano e anti-inflamatório e apresenta grande potencial para diversos tipos de patologias, porém não foram descritos os mecanismos de ação destas atividades biológicas (DANIEL e MEDEIROS, 2014; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA; PINTO, 2002).

Alguns estudos recentes mostram que o óleo extraídos das plantas do gênero *Copaifera* apresentam ação nociceptiva em modelos de dor inflamatória crônica, mas não especificam a espécie da qual o óleo foi extraído tratar-se de outras espécies como *Copaifera multijuga* (Hayne, 1827) (DANIEL e MEDEIROS, 2014; GOMES et al., 2010), além disso, estudos não trazer os mecanismos de ação bem estabelecidos em estudos já publicados.

No entanto, a identificação de mecanismos que possam sensibilizar ou ativar os receptores envolvidos em patologias dolorosas é um dos principais objetivos de pesquisas relacionadas à fisiopatologia da dor (XIA et al., 2011; HOFFMEISTER et al., 2014). Visto que, a ativação do receptor TRPV1 pode estar relacionada com esses mecanismos de desenvolvimento de dor, a descoberta de novos compostos que possam ser ligantes e possíveis antagonistas destes receptores é de grande importância para o desenvolvimento de novos analgésicos (JULIUS, 2013; MEOTTI et al., 2014).

Portanto, as plantas passaram a assumir um papel importante nos estudos referentes ao tratamento de inflamações e dores, com atuação de agonista ou antagonistas dos receptores das vias nociceptoras, tais como a morfina presente na papoula (*Papaver somniferum* L.), um analgésico, que é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de dores de alta intensidade (HAMILTON; BASKETT, 2000; LAUX-BIEHLMANN, 2013). Outro estudo pioneiro para o tratamento da dor e inflamação foi realizado a partir extratos de salgueiro (*Salix alba* L.), e levou a

produção química do ácido acetilsalicílico, resultando na descoberta de diversos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (ADEBAYO et al., 2015).

Os compostos ativos obtidos das plantas são utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. E os fitoterápicos são considerados como alvos para a descoberta de novos analgésicos e anti-inflamatórios, trazendo consigo a oportunidade de novos tratamentos para patologias com maior eficácia e menores efeitos colaterais (CALIXTO et al., 2005; MISHRA; TIWARI, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Dessa maneira, a procura por tratamentos eficazes para a dor inflamatória faz com que haja grande expectativa nos produtos naturais, podendo unificar o conhecimento empírico ao científico. Considerando que o uso deste óleo *Copaifera officinalis* é relatado desde o século XVI, pelos portugueses, por apresentar propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (MACIEL et al., 2002), e este produto vem sendo apontado como uma alternativa interessante para o tratamento mais específico e com menos efeitos adversos para patologias dolorosas. Portanto, o intuito desse estudo foi avaliar a ação antinociceptiva e antiinflamatória do óleo de *Copaifera officinalis* e avaliar o possível o envolvimento do receptor TRPV1 nestes efeitos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antinociceptiva do óleo de *Copaifera officinalis* em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se o óleo de *Copaifera officinalis* produz antinocicepção no teste de exposição da cada de camundongos ao calor;

Observar se o óleo de *Copaifera officinalis* reduz a nocicepção e o edema induzidos pela administração intraplantar de capsaicina em camundongos;

Investigar se o óleo de *Copaifera officinalis* reduz à nocicepção em um modelo de dor inflamatória crônica em camundongos;

Avaliar se o óleo de *Copaifera officinalis* promove efeitos adversos, como alterações na atividade locomotora, temperatura corporal, alterações renais, alterações no trânsito gastrointestinal ou lesão gástrica em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção do óleo utilizado no respectivo projeto se deu através da compra do mesmo em farmácias no município de Criciúma, Santa Catarina. Medicamento de notificação simplificada RDC ANVISA N°199/2006. AFE 1.00210-4. Óleo de copaíba – RES. ANVISA: 343/05 AUT. FUNC. 2.03056-0. Todos os reagentes experimentais, se não especificado no texto, foram comprados da empresa Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA).

Os protocolos experimentais estão em conformidade com as diretrizes de éticas atuais para a investigação de dor experimental em animais da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LABIM) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), com aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), da mesma, sob protocolo número 051/2015-1.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) linhagem Swiss albinos machos e fêmeas (25-35g), disponibilizados pelo biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Sendo acondicionados 6 animais por caixa e mantidos em ambiente climatizado ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12 horas, com comida e água *ad libitum*. Os camundongos foram utilizados apenas uma única vez nos experimentos e aclimatizados na sala de experimentação por 1 hora antes do início dos experimentos. O número de animais e de estímulos nociceptivos foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes dos protocolos (ZIMMERMANN, 1983). Os experimentadores fizeram a análise de modo cego ao tratamento medicamentoso na realização dos testes e ao grupo experimental, quando da realização dos protocolos experimentais foi seguido o protocolo ARRIVE guidelines (KILKENNY et al., 2009).

3.2 TESTES

3.2.1 Teste da retirada da cauda ao estímulo térmico

Primeiramente foi estabelecida uma curva de dose utilizando as doses de 1mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg do óleo de *Copaifera officinalis* no do teste de retirada da cauda ao estímulo térmico. Após, foi realizado uma curva de tempo com a dose mais eficaz no primeiro momento utilizada, a curva de dose foi observada 1 hora após a administração do óleo de *Copaifera officinalis*. Os demais testes seguirão com a dose e o tempo ideais já estabelecidos.

Utilizou-se o teste de retirada da cauda para avaliação da sensibilidade dos animais a uma estimulação térmica, pois os antagonistas do receptor TRPV1 apresentam efeito antinociceptivo neste teste (TREVISAN et al., 2012). Os animais foram previamente expostos a uma fonte de calor na cauda (banho-maria aquecido a 48°C) submergindo-a na água, sem expor o resto do corpo do animal. O tempo foi cronometrado até que os animais retirassem a cauda da água, deixando-as no tempo máximo de 18 segundos em contato com a água (para que não houvesse danos ao tecido da cauda dos animais) sendo que o tempo basal para esse teste é de 7 a 9 segundos e foi realizado antes dos diferentes tratamentos.

Posteriormente, os tratamentos foram realizados (óleo de *Copaifera officinalis* em diferentes doses 1, 3, 10 e 30 mg/kg, veículo 10 mL/kg (DMSO 1% em salina 0.9%), morfina (10 mg/kg), SB-66791 (3 mg/kg), todos o tratamento foram realizados por administração intragástrica (via gavagem) e após foi avaliada a curva de dose. E com a dose de 10 mg/kg do óleo de *Copaifera officinalis* foi realizada a curva em diferentes tempos (0.5, 1, 2, 3 e 4 horas) após a administração dos tratamentos, onde foram feitas novas medidas do tempo de retirada da cauda dos animais frente ao estímulo térmico. Uma redução significativa no tempo foi considerada como hiperalgesia térmica (percepção exagerada do estímulo nocivo), enquanto que aumento nesse tempo foi considerado como efeito antinociceptivo (TREVISAN et al., 2012).

3.2.2 Nocicepção espontânea induzida por administração intraplantar de capsaicina

Neste modelo os animais foram colocados em caixas transparentes de 20 x 20 x 20 cm e adaptados por 20 minutos no local (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Após este tempo, 20 µl de capsaicina (dose de 1 nmol/pata) foi injetada de forma intraplantar sob a superfície da pata traseira direita do camundongo. Durante 5 minutos foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, o que foi considerado como indicativo de nocicepção. Os grupos experimentais utilizados neste teste foram óleo de *Copaifera officinalis* 10 mg/kg, veículo (10 mL/kg, DMSO 1% em salina 0.9%), morfina 10 mg/kg e SB-366791 (3 mg/kg), dessa forma observou-se a atividade antinociceptiva e antiedematogênica dos mesmos. O desenvolvimento de edema foi avaliado nos mesmos animais utilizados para a determinação da atividade antinociceptiva dos compostos, sendo medidos 15 minutos após a administração de capsaicina via intraplantar, com o uso de um paquímetro digital (TREVISAN et al., 2012). O edema de pata foi expresso como a medida da diferença entre a espessura de pata após a administração de capsaicina e o valor basal da espessura de pata do animal. Os efeitos analgésicos e antiedematogênicos foram avaliados após 1 hora da administração dos diferentes tratamentos por via oral.

3.2.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica, induzido pela administração intraplantar de adjuvante completo de Freund (ACF)

Para induzir o modelo de dor inflamatória crônica, 20 µl de ACF (adjuvante completo de Freund, suspensão formada por 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado pelo calor) foi administrado na superfície plantar da pata direita (i.pl.) de forma subcutânea (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Esta dose de ACF é capaz de produzir inflamação e também alodinia mecânica, e é considerado como um modelo de dor inflamatória crônica (REF). Os animais controles foram administrados na pata (i.pl.) com tampão fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,4; 20 µl).

Para estudar a sensibilidade a estímulos mecânicos foi realizado o teste utilizando filamentos de Von Frey de intensidade crescente (0,07-2 g) (DIXON, 1980;

ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Brevemente, os animais foram ambientados no local de experimentação, que consiste em câmaras elevadas com chão de tela metálica, durante 1 hora. Após esse período, foi realizada a estimulação da pata traseira direita de cada animal com filamentos de von Frey pelo método de *up-and-down*. O primeiro filamento utilizado promoveu uma pressão de 0,6 g, caso ocorresse a retirada da pata foi aplicado um filamento com pressão menor. Caso não ocorresse retirada, foi utilizado um filamento com pressão maior. No total, foram realizadas seis estimulações, utilizando os filamentos de 0,07; 0,16; 0,40; 0,6; 1,4 e 2,0 g. Com os resultados obtidos, calculou-se o valor correspondente a 50% do limiar, em g, que cada animal suporta (limiar 50%). Uma diminuição deste valor foi considerada como hiperalgesia mecânica e uma reversão nesta queda como sendo um efeito antinociceptivo (anti-alodínico).

3.2.4 Avaliação da atividade locomotora e da temperatura dos animais

Para investigar a possibilidade do desenvolvimento de efeitos não específicos músculo-relaxantes e/ou sedativos dos tratamentos, os animais foram submetidos à avaliação da atividade locomotora (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Inicialmente, os animais foram avaliados no teste da locomoção espontânea em campo aberto. Para isso, os animais foram expostos durante cinco minutos a uma caixa de acrílico nas dimensões de 50 × 50 × 25 cm, dividida em 12 quadrados iguais. O número de vezes que o animal cruzou de um quadrado para outro (cruzamentos), bem como o número de vezes que o animal permaneceu sobre as duas patas traseiras para explorar o ambiente (resposta de levantar) foi analisado 1 hora após a administração dos tratamentos (óleo de *Copaifera officinalis* 10 mg/kg, veículo, morfina 10 mg/kg, tem SB-366791 - 3 mg/kg).

Para a avaliação da atividade locomotora forçada, os animais foram submetidos ao teste do cilindro giratório. Brevemente, um dia antes do teste, os animais foram colocados sobre o cilindro giratório (ROTA ROD-RR 2002) a 8 rpm e permanecendo sobre o mesmo, sem cair, durante 1 minuto (treino). No dia do teste, os animais permaneceram durante 4 minutos sobre o cilindro giratório, e o tempo decorrido até a primeira queda, bem como o número total de quedas foi contado, 1 hora após a administração dos tratamentos (óleo de *Copaifera officinalis* - 10 mg/kg,

veículo, e SB-366791 - 3 mg/kg e morfina - 10 mg/kg) (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012).

Uma vez que os tratamentos foram avaliados no teste da capsaicina e outros testes envolvendo os mecanismos de percepção térmica, mudanças na temperatura corporal poderiam alterar os resultados. Além disso, alterações na temperatura corporal podem ser consideradas um efeito adverso grave dos antagonistas TRPV1, e para investigar essa possibilidade, foi realizada a medida da temperatura corporal dos animais antes do tratamento com termômetro digital, e 1 hora após a administração dos tratamentos (óleo de *Copaifera officinalis* - 10 mg/kg, veículo, morfina - 10 mg/kg e SB-366791 - 3 mg/kg). Os dados foram mostrados como variação entre as diferentes medidas realizadas, em relação aos valores iniciais (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Neste experimento foram utilizados os mesmos animais em que foi avaliada a atividade locomotora.

3.2.5 Trânsito gastrointestinal

Também foi testado o possível efeito adverso do óleo de copaíba sob o trânsito gastrointestinal. Neste estudo, os camundongos foram mantidos em jejum por 16 horas antes da análise do trânsito gastrointestinal, como descrito posteriormente. Os animais foram tratados durante sete dias com o óleo de copaíba (10 mg/kg), veículo (10 mL/kg, DMSO 1% em salina 0.9%) morfina (10 mg/kg) e SB-366791 (3 mg/kg) e no último dia 40 minutos depois da administração dos tratamentos, uma mistura de carvão ativado padrão (5% de carvão ativado, 20% Goma arábica, 0,3 mL) foi dada aos camundongos via oral. Vinte minutos após a administração da mistura de carvão ativado, os animais sofreram eutanásia. O estômago e intestino delgado e grosso foram removidos para medir o comprimento do intestino (do esfíncter pilórico às junções ileocecal, o comprimento total do intestino) e a distância percorrida pela refeição de carvão ativado. A atividade propulsiva do intestino foi determinada pela porcentagem de carvão no trânsito gastrointestinal, calculado como: $\% \text{ distância percorrida} = 100 \times (\text{distância percorrida pelo carvão} / \text{comprimento total do intestino})$ (MILANO et al., 2008).

3.2.7 Atividade ulcerogênica

Para avaliar o efeito sobre a mucosa gástrica dos diferentes tratamentos realizados durante sete dias, no modelo de dor crônica, os animais sofreram eutanásia 1 hora após a última administração do óleo de copaíba (10 mg/kg), veículo (10 mL/kg, DMSO 1% em salina 0.9%) morfina (10 mg/kg) ou SB-366791 (3 mg/kg) e os estômagos foram retirados para avaliação da mucosa. As lesões foram analisadas com o auxílio de uma lupa, e foram quantificadas de acordo com o número de lesões e o tamanho utilizando uma escala de 0 a 5 pontos: (0) sem danos, (1) modificação da cor, (2) poucas petequias e alteração da vilosidade, (3) 1-3 pequenas lesões (menores de 1 mm de comprimento), (3) 1-3 grandes lesões (>1 mm), (4) mais que 3 pequenas lesões, (5) mais que 3 grandes lesões (MAGISTRETTI; CONTI; CRISTONI, 1988).

3.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias; ou por teste “t” de Student, conforme o protocolo experimental. Os testes post hoc Bonferroni (ANOVA de uma ou duas vias) foi utilizado quando necessário. O *Software 5.0 GraphPad* (GraphPad, USA) foi utilizado para fazer as análises. Para verificar o nível de significância estabelecida entre os grupos foram consideradas valores de *P* menores de 0,05 ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

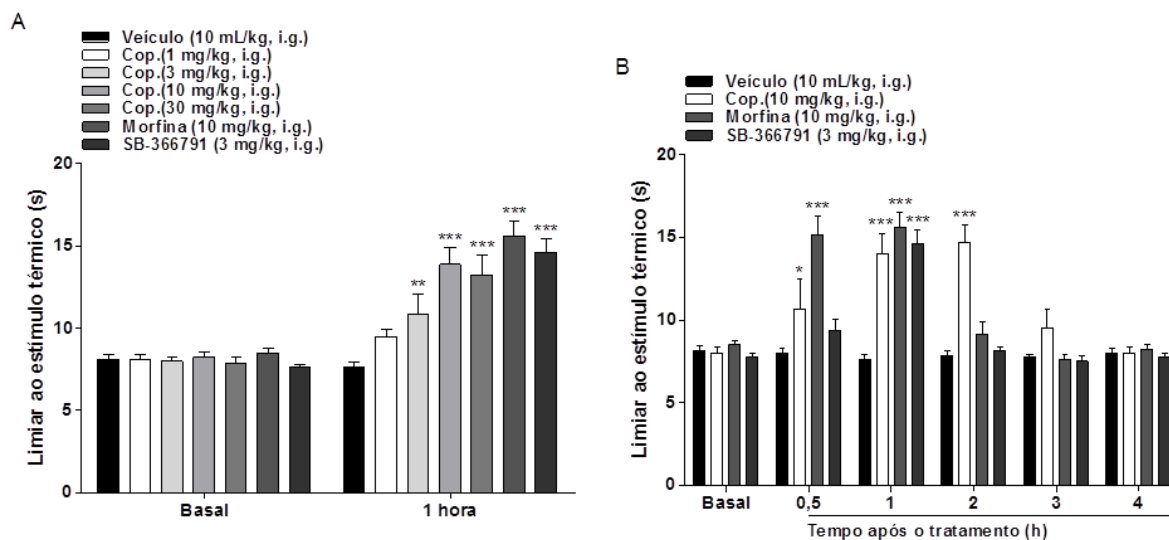
4.1 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO DE *Copaifera officinalis* NO MODELO DE DOR AGUDA CAUSADA PELA EXPOSIÇÃO AO CALOR

Na avaliação da atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda ao calor nocivo, na curva de dose, foi observado o efeito de diferentes doses do óleo (3, 10, 30 mg/kg; i.g.) após o tempo de 1 hora do tratamento (Figura 3A). Na curva de tempo foi observado o efeito em diferentes tempos de uma mesma dose do óleo (10 mg/kg; i.g.) (Figura 3B). O composto SB-366791 (antagonista seletivo do receptor TRPV1, 3 mg/kg; i.g.) foi utilizado como controle positivo do teste assim como morfina (10 mg/kg; i.g.).

A administração de diferentes doses do óleo de *Copaifera officinalis* mostrou que as doses de 3, 10 e 30 mg/kg levaram a inibição de $60 \pm 19\%$, $77 \pm 16\%$ e $73 \pm 19\%$ respectivamente), produzindo então efeito antinociceptivo no teste de retirada da cauda ao estímulo térmico 1 hora após o tratamento (Figura 3A). Também, quando administramos o antagonista do receptor TRPV1 (SB-366791, 3 mg/kg) ou morfina (10 mg/kg; i.g.) observamos um efeito antinociceptivo (inibição de $87 \pm 15\%$ e $80 \pm 13\%$ respectivamente) 1 hora após o tratamento (Figura 3A).

A detecção em diferentes tempos do efeito do óleo de *Copaifera officinalis* i.g. (0,5, 1, 2, 3, 4 horas), mostrou que nos tempos de 0,5, 1 e 2 duas horas o óleo de *Copaifera officinalis* levou a inibição de $59 \pm 24\%$, $78 \pm 17\%$ e $81 \pm 14\%$ respectivamente, morfina (10 mg/kg; i.g.) levou a inibição de $84 \pm 18\%$, $87 \pm 14\%$ nos tempos de 0,5 e 1 hora e o SB-366791 (3 mg/kg) levou a inibição de $81 \pm 12\%$, 1 hora após o tratamento (Figura 3B).

Figura 3 - Curva de dose (A) e de tempo (B) para o efeito do óleo de *Copaifera officinalis* no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico ao calor em camundongos.



Fonte: Da autora, 2016.

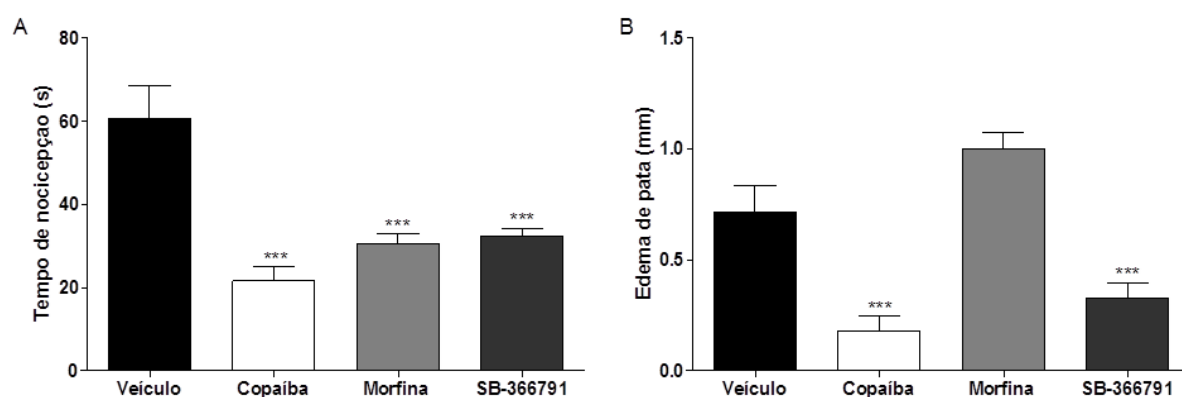
A administração do óleo de *Copaifera officinalis* causou efeito antinociceptivo no modelo de dor aguda causada pela exposição ao calor em camundongos. (A) Avaliação do efeito antinociceptivo do óleo de *Copaifera officinalis* (Cop. 1, 3, 10 e 30 mg/kg, i.g.), SB-366791 (3 mg/kg, antagonista seletivo do receptor TRPV1 utilizado como controle positivo), morfina (10 mg/kg, i.g, controle positivo) ou veículo (10 mL/kg, i.g.) observado 1 hora após a administração intragástrica (i.g.) no modelo de dor aguda causada pela exposição ao calor em camundongos. (B) Curva de tempo para a medida do efeito antinociceptivo de *Copaifera officinalis* (Cop. 10 mg/kg, i. g), SB-366791 (3 mg/kg), morfina (10 mg/kg, i.g) ou veículo (10 mL/kg, i.g.) 0,5 a 4 horas após a administração intragástrica (i.g.). Os dados foram representados como média \pm S.E.M. (n = 6-8 animais). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (gráfico A, ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni; gráfico B, ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc Bonferroni).

4.2 A ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO DE *Copaifera officinalis* CAUSOU EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIEDEMATOGÊNICO NO MODELO DE DOR INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA TRPV1.

O óleo de *Copaifera officinalis* mostrou efeito antinociceptivo e antiedematogênico no modelo de nocicepção induzida pela administração de capsaicina (i.pl.) um agonista TRPV1. O tratamento com óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, i.g.) produziu uma resposta antinociceptiva 1 hora após o tratamento, com um valor de inibição de $60 \pm 18\%$, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 4A). Da mesma forma o óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, i.g.) mostrou efeito antiedematogênico no tempo de 1 hora, com valor de inibição de $76 \pm 24\%$, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 4B). Já o antagonista TRPV1 SB-366791 (3 mg/kg, i.g.) mostrou efeito antinociceptivo (inibição de $40 \pm$

9%, 1 hora após o tratamento) e antiedematogênico (inibição de $57 \pm 24\%$, 1 hora após o tratamento). Enquanto que a administração de morfina (10 mg/kg, i.g.) mostrou efeito antinociceptivo (inibição de $43 \pm 12\%$, 1 hora após o tratamento), após o tratamento no modelo de administração de capsaicina como observado nas figuras 4A e 4B, porém não causou efeito antiedematogênico.

Figura 4 - Efeito (A) antinociceptivo e (B) antiedematogênico do óleo de *Copaifera officinalis* no teste de nocicepção induzida por administração intraplantar de capsaicina em camundongos.



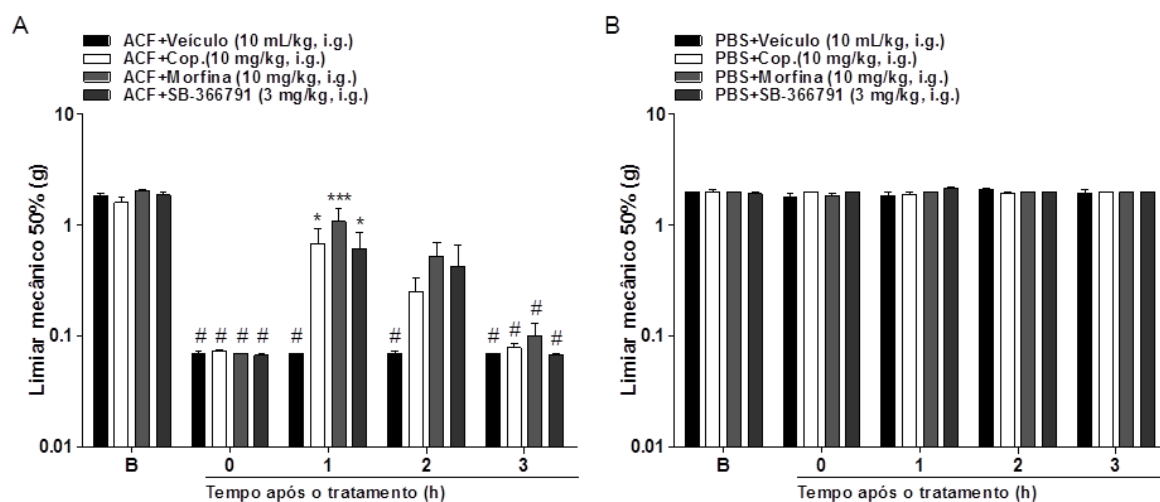
Fonte: Da autora, 2016.

A administração do óleo da planta *Copaifera officinalis* causou efeito antinociceptivo e antiedematogênico no modelo de dor induzida pela administração do agonista TRPV1 (capsaicina, intraplantar) em camundongos. Avaliação do efeito (A) antinociceptivo ou (B) antiedematogênico do óleo de *Copaifera officinalis* (Cop, 10 mg/kg, i.g.), o SB-366791 (3 mg/kg, i.g., antagonista seletivo do receptor TPV1) foi utilizado como controle positivo), morfina (10 mg/kg i.g., controle positivo) ou veículo (10 mL/kg, i.g) em doses únicas no tempo de 1 hora no modelo de dor induzida pela administração de capsaicina i.pl. em camundongos. Este modelo consiste na injeção de 20 μ l de capsaicina (dose de 1 nmol/pata) de forma intraplantar (i.pl., subcutânea) sob a superfície da pata traseira direita. A nocicepção foi avaliada por 5 minutos (tempo que o animal permaneceu lambendo a pata), enquanto que o edema foi avaliado através de um paquímetro digital 15 minutos após a administração de capsaicina. O edema de pata representa a diferença entre a espessura de pata após a administração de capsaicina e o valor basal. Os dados foram representados como média \pm S.E.M. (n = 7 animais). *** $P < 0.001$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni).

4.3 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE *Copaifera officinalis* CAUSOU EFEITO ANTI-ALODÍNICO NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE ACF

A administração de ACF na pata de camundongos causou alodínia mecânica 48 horas após a injeção, onde observou-se uma redução do limiar mecânico quando comparado ao grupo controle. Então o óleo de *Copaifera officinalis* (Cop, 10 mg/kg; i.g.) apresentou efeito anti-alodínico no modelo de dor inflamatória crônica causada pela administração de ACF em camundongos após o tratamento no tempo de 1 hora. Os valores de inibição calculados 1 hora após os tratamentos para o efeito observado em relação ao estímulo mecânico foram de $90 \pm 10\%$ para o óleo de *Copaifera officinalis*, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 5A). O tratamento com SB-366791 (3 mg/kg; i.g.) apresentou efeito 1 hora após o tratamento com valor de inibição de $85 \pm 13\%$. E a morfina (10 mg/kg; i.g) apresentou efeito 1 hora após o tratamento com valor de inibição de $91 \pm 10\%$. Os animais que receberam a administração de PBS (10 mL/kg, i.g.) e após foram administrados com os diferentes tratamentos não mostraram alteração em relação ao limiar ao estímulo mecânico, mostrando que os tratamentos não influenciaram a percepção desta forma de estímulo (Figura 5B).

Figura 5 - Avaliação do efeito (A) anti-alodínico do óleo de *Copaifera officinalis* após a administração de ACF na pata de camundongos. (B) Limiar mecânico observado em camundongos após a administração intraplantar (i.pl.) de PBS (grupo controle).



Fonte: Da autora, 2016.

A administração do óleo da planta *Copaifera officinalis* causou efeito anti-alodínico no modelo de dor inflamatória crônica induzida pela administração do Adjuvante completo de Freund (ACF) em camundongos. Avaliação do efeito (A) anti-alodínico frente ao estímulo mecânico 1 hora após a administração intragástrica (i.g.). Avaliação do efeito do óleo da planta *Copaifera officinalis* frente ao limiar ao estímulo mecânico (B) de animais controles. O SB-366791 (3 mg/kg, antagonista seletivo do receptor TRPV1 foi utilizado como controle positivo) assim como a morfina (10 mg/kg i.g.). O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamento de Von Frey de diferentes intensidades (0,07-2 g). O modelo de dor inflamatória crônica consiste na administração de 20 µL de ACF (Adjuvante Completo de Freund) na superfície plantar da pata direita traseira (i.pl.), os animais controles foram administrados com tampão PBS i.pl. (20 µL). As medidas basais foram representadas como B no gráfico, e o tempo 0 representa as medidas realizadas 48 horas após a administração de PBS ou ACF i.pl. em camundongos. Os dados foram representados como média ± S.E.M. (n = 7). #p < 0.001, quando comparado aos valores basais; ***p < 0.001, quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc Bonferroni).

4.4 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE *Copaifera officinallis* NÃO PRODUZIU ALTERAÇÕES DETECTÁVEIS NOS TESTES DE LOCOMOÇÃO OU NA TEMPERATURA CORPORAL DOS ANIMAIS

O tratamento com óleo de *Copaifera officinallis* (Cop. 10 mg/kg, i.g.) não foi capaz de alterar a locomoção espontânea ou forçada avaliadas pelos testes do campo aberto ou do cilindro giratório, respectivamente (Tabela 1), quando comparados com animais injetados com veículo 1 hora após a administração.

Tabela 1 - Avaliação da atividade locomotora. A atividade locomotora espontânea (campo aberto) e forçada (cilindro giratório) observada 1 hora após a administração do óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, via intragástrica, i.g.), Veículo 1% DMSO em 0,9% NaCl, morfina (10 mg/kg) e o SB (3 mg/kg)

Tratamento (i.g.)	Campo aberto		Cilindro giratório	
	Cruzamentos	Elevações verticais	Número de quedas	Latência para a 1ª queda
Veículo (10 ml/kg)	50 ± 11	22 ± 6	0,8 ± 1,1	40 ± 46
Cop. (10 mg/kg)	44 ± 9	16 ± 3	1,1 ± 0,9	33 ± 42
Morf. (10 mg/kg)	74 ± 9	14 ± 4	0,7 ± 0,3	85 ± 95
SB-366791 (3 mg/kg)	37 ± 5	15 ± 4	0,8 ± 0,4	50 ± 56

Fonte: Da autora, 2016.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos; ANOVA de 1 via seguida pelo post hoc de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n=8).

Além disso, o óleo de *Copaifera officinalis* não provocou efeito hipertérmico após 1 hora da administração intragástrica.

Tabela 2 – Avaliação da temperatura corporal. A temperatura corporal foi avaliada 1 hora após a administração do óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, via intragástrica, i.g.), veículo (1% DMSO em 0,9% NaCl; 10 ml/kg, i.g.), morfina (10 mg/kg, i.g.) ou SB-366791 (3 mg/kg, i.g.).

Tratamento (i.g.)	Temperatura corporal (°C)	
	Basal	1 hora após o tratamento
Veículo (10 ml/kg)	35,8 ± 0,2	35,2 ± 0,2
Cop. (10 mg/kg)	36,0 ± 0,4	36,6 ± 5
Morf. (10 mg/kg)	35,6 ± 0,4	35,6 ± 0,2
SB-366791 (3 mg/kg)	35,2 ± 0,2	36,1 ± 0,2

Fonte: Da autora, 2016.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos; ANOVA de 1 via seguida pelo post hoc de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n=8).

4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO DE *Copaifera officinalis* SOBRE PARÂMETROS DE LESÃO RENAL

Administração do óleo de *Copaifera officinalis* (Cop, 10 mg/kg) não causou alteração nos níveis de creatinina ou ureia no soro (indicadores de lesão renal) (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação dos níveis de ureia e creatinina no soro. Efeito da administração do óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, via intragástrica, i.g.), veículo (10 ml/kg, i.g.), morfina (10 mg/kg, i.g.) ou SB-366791 (3 mg/kg, i.g.) sobre os níveis de ureia e creatinina no soro 1 horas após a administração.

Tratamento (via oral)	Função renal (mg/dL)	
	Ureia	Creatinina:
Veículo (10 ml/kg)	72,82 ± 56,93	4,60 ± 1,69
Cop. (10 mg/kg)	63,17 ± 38,24	5,47 ± 3,67
Morf. (10 mg/kg)	74,55 ± 21,60	3,50 ± 5,70
SB-366791 (3 mg/kg)	70,39 ± 13,07	4,35 ± 6,20

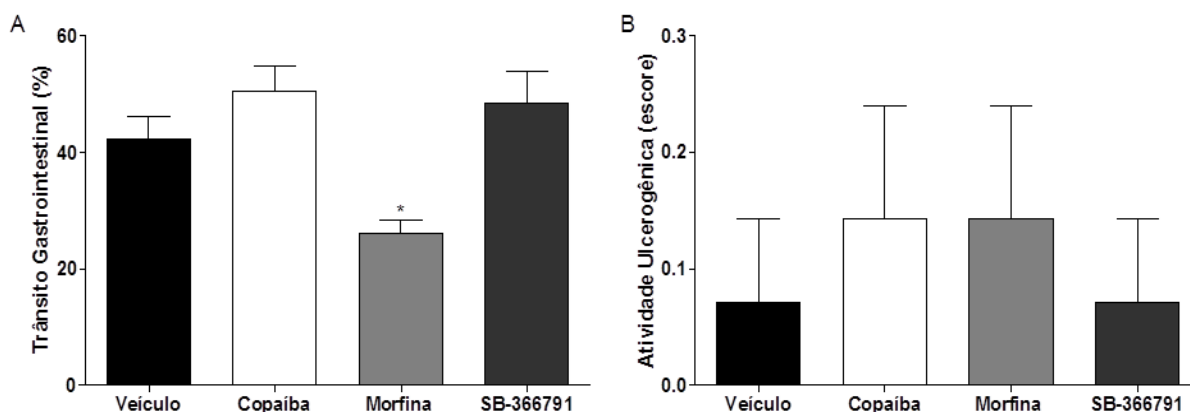
Fonte: Da autora, 2016.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos; ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n=8).

4.6 O TRATAMENTO COM ÓLEO DE *Copaifera officinalis* NÃO PROVOCOU ALTERAÇÃO NO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL OU INDUZIU ATIVIDADE ULCEROGÊNICA

O óleo de *Copaifera officinalis* (Cop, 10 mg/kg) não provocou alteração do trânsito gastrointestinal (Figura 6A) e atividade ulcerogênica (Figura 6B) comparado ao grupo controle (veículo). Porém, a administração de morfina (10 mg/kg, i.g.) causou redução significativa do trânsito gastrointestinal 1 hora após o tratamento. O SB-366791 (3 mg/kg).

Figura 6 - Avaliação da atividade gastrointestinal (A) e atividade ulcerogênica (B) observada 1 hora após a administração do óleo de *Copaifera officinalis* (10 mg/kg, via intragástrica, i.g.), Veículo 1% DMSO em 0,9% NaCl, morfina (10 mg/kg) e o SB (3 mg/kg).



Fonte: Da autora, 2016.

A administração do óleo da planta *Copaifera officinalis* não provocou alteração no trânsito gastrointestinal (A) ou atividade ulcerogênica (B). Avaliação do trânsito gastrointestinal após a administração (1 hora após) de (Cop., 10 mg/kg, i.g), morfina (10 mg/kg, i.g.), SB-366791 (3 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mg/kg, i.g.). O trânsito gastrointestinal foi expresso em % em relação a distância percorrida pela mistura contendo carvão ativado (5% de carvão ativado, 20% goma arábica, 0,3 ml), este foi administrado 40 minutos após os tratamentos, e após 20 minutos foi verificado o trânsito gastrointestinal. (B) determinação da atividade ulcerogênica causada pela administração do óleo da planta *Copaifera officinalis* (Cop., 10 mg/kg, i.g), morfina (10 mg/kg, i.g.), SB-366791 (3 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mg/kg, i.g.). A atividade ulcerogênica foi expressa em escores de lesões gástricas (0 - sem lesão, 5 - pontuação máxima de lesão gástrica). Os dados foram expressos com média \pm sem (a) ou média \pm intervalo interquartil (B). (n = 8). * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo tratado com veículo (anova de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

As patologias dolorosas são frequentes problemas de saúde que levam os pacientes à procura por cuidados médicos, a fim de terem um controle sob as mesmas de maneira eficiente e segura (PAL et al., 2009). Dentre os diferentes tipos de dores classificados entre aguda e crônica, a dor crônica, causa um impacto negativo maior na qualidade de vida dos acometidos e também leva à grandes custos econômicos para as redes de saúde, dentre estas patologias devemos considerar as de fonte inflamatória como muito relevantes (KING; FRASER, 2013). Mesmo com esses grandes impactos que a dor causa os fármacos disponíveis atualmente não apresentam eficácia total ou ainda causam, em grande parte, efeitos adversos significativos. Portanto há necessidade de melhores tratamentos para patologias dolorosas como a dor inflamatória crônica (BARON, 2009; MALEK et al., 2015; SAULINO; KIM; SHAW, 2014).

Dessa forma, a busca de novos analgésicos a partir de produtos naturais para o alívio da dor é relevante e continua proporcionando novas alternativas de tratamento (MISHRA; TIWARI, 2011). E estes compostos naturais podem ser fonte de novas alternativas que envolvam a modulação de receptores envolvidos na transmissão da dor causando analgesia ou ação anti-inflamatória (KING; FRASER, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014), isso pode ocorrer pelo motivo das plantas apresentarem inúmeros compostos bioativos (MENDONÇA; ONOFRE, 2009).

Os produtos naturais já são muitas vezes distribuídos em sua forma bruta, pelas unidades de saúde pública a fim de baratear custos com medicamentos sintetizados (SIXEL; PECINALLI, 2005). Diversos estudos têm mostrado que é ainda disseminado o uso popular de produtos naturais para o tratamento da dor neuropática e inflamatória, e talvez estas plantas medicinais apresentem em sua composição compostos que possam bloquear a atividade de neurônios periféricos sensoriais responsáveis na codificação e transmissão de estímulos nocivos (PEPPIN; PAPPAGALLO, 2014; SCHUMACHER, 2010).

Dessa maneira, novos alvos têm sido explorados para a descoberta de analgésicos derivados de produtos naturais, como o receptor TRPV1 (CALIXTO et al., 2000; JULIUS, 2013). Uma das principais razões que levam a crer que o canal

TRPV1 seria um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos, é porque este receptor participa na detecção e transmissão dos processos nociceptivos no sistema nervoso periférico e central (JULIUS, 2013; SCHUMACHER, 2010). Então, o bloqueio deste canal por compostos oriundos de produtos naturais poderia contribuir para inibição da transmissão de estímulos dolorosos (BASBAUM et al., 2009; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014). Até o momento, diferentes compostos naturais identificados em plantas medicinais foram capazes de agir como antagonistas do receptor TRPV1 (BORGHI et al., 2013; NEACSU et al., 2010; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012; VERANO et al., 2013), ou ainda extratos de plantas parecem exercer seus papel analgésico por interagir com este receptor (NGUELEFACK et al., 2015; WANG et al., 2015).

Neste estudo procurou-se identificar as propriedades antinociceptivas e o mecanismo de ação do óleo de *Copaifera officinalis* em relação ao envolvimento com o receptor TRPV1. Primeiramente, observamos que o óleo apresentou potencial antinociceptivo em modelos pré-clínicos de dor aguda como o teste de retirada da cauda ao estímulo térmico e o teste de nocicepção induzido pela injeção intraplantar de capsaicina. Além disso, o óleo apresentou efeito antinociceptivo no modelo pré-clínico de dor inflamatória crônica causada pela administração intraplantar de ACF. Também não foram observados efeitos adversos consideráveis após administração aguda do óleo de *Copaifera officinalis* em camundongos. Pois, a administração do óleo de *Copaifera officinalis* não causou alteração locomotora, na temperatura corporal, e também não induziu modificação de parâmetros de lesão renal no soro de camundongos. Além disso, o tratamento não provocou alteração no trânsito gastrointestinal, nem tampouco atividade ulcerogênica em camundongos.

Os resultados obtidos foram realizados em modelos pré-clínicos de dor aguda onde o receptor TRPV1 tem papel significativo, como os testes que envolvem respostas ao calor nocivo (HOFFMEISTER et al., 2014; RIES et al., 2009). O receptor TRPV1 é um dos principais termorreceptores envolvidos na proteção do organismo a estímulos nocivos térmicos expressos em fibras sensoriais do tipo A- δ e fibras C, sendo ativado em temperaturas maiores que 42-43°C (JULIUS, 2013; LAING; DHAKA, 2016). Dessa forma, animais que apresentam deleção gênica para este receptor, e são expostos a testes que envolvem respostas ao calor nocivo, os mesmos apresentam latência aumentada para este estímulo (CATERINA et al., 1997; DAVIS et al., 2000). Além disso, a administração de antagonistas TRPV1

causam efeitos antinociceptivos em testes que envolvem respostas ao calor nocivo, mostrando que este teste é sensível a este tipo de composto (ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Assim no modelo pré-clínico de dor aguda causada pela exposição ao calor nocivo em camundongos, os resultados do presente estudo mostraram que o óleo de *Copaifera officinalis* administrado via oral apresentou efeito antinociceptivo, sugerindo então que o mesmo possa estar apresentando ações antinociceptivas por interagir com o receptor TRPV1 (CATERINA et al., 1997; DAVIS et al., 2000; TOMINAGA et al., 1998).

Porém, estudos em pacientes que receberam antagonistas TRPV1 em testes clínicos, observaram também que estes apresentam insensibilidade ao calor nocivo, o que poderia ser indicado como um efeito adverso deste tratamento, porque poderia induzir a lesão por queimaduras por causar uma insensibilidade exacerbada a fontes de calor nocivo (MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014; SCHUMACHER, 2010). Dessa forma, foi relevante observar que o óleo de *Copaifera officinalis* não causou este efeito por tempo prolongado em camundongos e também não causou inibição máxima, assim mostrando que não causou efeitos adversos desta forma de insensibilidade por tempo prolongado.

O modelo pré-clínico de dor aguda causado pela administração de capsaicina tem sido um modelo relevante na descoberta de novos compostos capazes de modular o receptor TRPV1, levando em conta que a capsaicina é um agonista seletivo deste receptor capaz de induzir nocicepção aguda e edema de pata em animais experimentais quando administrada por via intraplantar (SAKURADA et al., 1992; TREVISAN et al., 2012). Este composto também desencadeia dor em queimação e vasodilatação quando administrada na pele em seres humanos (HENZE; URBAN, 2010; JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014; SIMONE; BAUMANN; LAMOTTE, 1989), mostrando que este modelo de dor pode ser identificado também na clínica.

A ativação das fibras do tipo C (peptidérgicas) por agonistas TRPV1 como a capsaicina provoca também vasodilatação cutânea na região aplicada causando edema local e inflamação neurogênica induzida pela liberação de peptídeos como o CGRP e a substância P (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; EVANGELISTA, 2015; MITTELSTADT et al., 2012). Dessa forma, este modelo pré-clínico de nocicepção é considerado de dor aguda, porque a nocicepção espontânea dura cerca de 5

minutos após a administração e o edema foi observado após 15 minutos (TREVISAN et al., 2012).

Assim, este modelo tem sido utilizado para a avaliação dos efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos de compostos recentemente estudados (HONORE et al., 2009; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012; UCHYTILOVA; SPICAROVA; PALECEK, 2014). Portanto, foi observado que o óleo de *Copaifera officinalis* apresentou efeito antinociceptivo e antiedematogênico neste modelo de dor aguda induzida pela administração intraplantar do agonista TRPV1 (capsaicina). Previamente, foi descrito que antagonistas do receptor TRPV1 são capazes de reduzir tanto o desenvolvimento do edema quanto a nocicepção neste modelo de dor aguda desencadeada pela administração intraplantar de capsaicina (TREVISAN et al., 2012). Enquanto que outros fármacos como opioides ou anti-inflamatórios não esteroidais apenas reduzem a nocicepção e não o desenvolvimento de edema (NOGUEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Nos testes da retirada da cauda ao estímulo térmico e o teste de administração intraplantar de capsaicina foi avaliado o efeito antinociceptivo do óleo de *Copaifera Officinalis*, porém estes testes são considerados modelos pré-clínicos de dor aguda e não representam modelos pré-clínicos de dor de relevância clínica (NEGUS et al., 2006; SAKURADA et al., 1992; YU et al., 2008).

Neste contexto, em um segundo momento, foi avaliado o efeito anti-alodínico do óleo de *Copaifera officinalis* no modelo de dor crônica causada pela administração intraplantar de ACF. Este modelo consiste na administração intraplantar (subcutânea) na pata traseira de camundongos de um agente inflamatório o ACF, que após 48 horas da aplicação causa o desenvolvimento de alodínia mecânica, hiperalgesia térmica e inflamação (representada pelo aparecimento de edema) (CODERRE; WALL, 1987; HELYES et al., 2004; SILVA et al., 2013). Todos estes sintomas são importantes na prática clínica e representam um problema no tratamento de pacientes com dor inflamatória crônica como no caso das artrites (PETER-SZABO et al., 2007). Além disso, os fármacos utilizados para o tratamento de artrites como anti-inflamatórios não esteroidais e corticoides, causam efeitos adversos relevantes e possuem eficácia reduzida em muitos pacientes (LABIANCA et al., 2012). Assim, é importante a busca de novas alternativas de tratamento que possuam um mecanismo de ação alternativo para o tratamento da dor inflamatória crônica (KING; FRASER, 2013; MILANO et al., 2008). Neste estudo,

foi observado que o tratamento com óleo de *Copaifera officinalis* foi capaz de reduzir a alodinia mecânica no modelo de dor inflamatória crônica causada pela administração intraplantar de ACF.

Quando antagonistas do receptor TRPV1 foram testados em modelos pré-clínicos de dor inflamatória estes apresentaram efeito anti-alodínico (estímulo mecânico), e também redução de sintomas de inflamação (GAVVA et al., 2008; HONORE et al., 2009; ROSSATO et al., 2011; SCHUMACHER, 2010). O canal TRPV1 é um importante sensor polimodal expresso em neurônios nociceptivos e pode ser sensibilizado por mediadores inflamatórios no local da lesão tecidual (MALEK et al., 2015; TOMINAGA et al., 1998). Dessa forma, este receptor é considerado um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos (JARA-OSEGUERA; SIMON; ROSENBAUM, 2008; SCHUMACHER, 2010; WONG; GAVVA, 2009).

Deste modo, o óleo de *Copaifera officinalis* apresenta em partes efeitos semelhantes aos observados para outros antagonistas deste receptor no modelo de dor inflamatória causado por adjuvante (ACF) (AMAYA et al., 2003; HONORE et al., 2009; LUO et al., 2015; MCGARAUGHTY et al., 2008, 2010; OGNYANOV et al., 2006; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012; YU et al., 2008). O tratamento com o SB-366791 foi capaz de reduzir o desenvolvimento de alodinia mecânica. Previamente, foi descrito que animais com deleção gênica para o receptor TRPV1 quando administrados com ACF intraplantar apresentaram redução no desenvolvimento de alodinia mecânica, hiperalgesia térmica e edema (SZABÓ et al., 2005). Além disso, já foi observado que após a administração de ACF ocorre um aumento na expressão do receptor TRPV1 em fibras mielinizadas do tipo A, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de alodinia mecânica neste modelo de dor em animais (AMAYA et al., 2003; MCGARAUGHTY et al., 2008). Entretanto, não foi observada alteração na detecção de resposta aos estímulos mecânicos nos animais controles (injetados com PBS).

A planta *Copaifera officinalis* apresenta descrição para o tratamento de processos inflamatórios (DAVIES, [s.d.]; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009), e previamente foi descrito que os extratos desta planta poderiam reduzir a inflamação (SIXEL; PECINALLI, 2005). Porém, o mecanismo de ação envolvido na ação anti-inflamatória ainda não tinha sido avaliado. Para o desenvolvimento de um novo analgésico é relevante observar a presença de efeitos

adversos que possam impossibilitando a entrada deste produto na clínica, como o desenvolvimento de sedação ou alterações locomotoras (NEGUS et al., 2006). Também, é interessante observar os efeitos locomotores nos animais porque compostos que causam efeito músculo-relaxantes inespecíficos poderiam reduzir a resposta dos animais a estímulos dolorosos, o que poderia causar a detecção de resultados falso-positivos (LABUZ; MACHELSKA, 2013) Porém, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a administração oral do óleo de *Copaifera officinalis* não produziu efeitos adversos detectáveis em camundongos, tanto no teste da locomoção em campo aberto ou do cilindro giratório.

No entanto, como muitos compostos antagonistas do canal TRPV1 apresentaram efeito adverso considerável no desenvolvimento de hipertermia severa, isso impediu o desenvolvimento desses compostos como possíveis fármacos analgésicos (GAVVA et al., 2008). Porém, ao tratamento com o óleo de *Copaifera officinalis* não causou alteração na temperatura corporal, assim sugere que o óleo pode oferecer uma ação analgésica mais segura comparando com outros antagonistas TRPV1 testados até o momento. Além disso, a administração óleo de *Copaifera officinalis* não provocou modificações de nenhum parâmetro renal como níveis de creatinina e ureia em soro dos camundongos.

Além disso, os principais compostos utilizados na clínica para o tratamento da dor crônica inflamatória são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (GHOSH; ALAJBEGOVIC; GOMES, 2015), que causam efeitos adversos consideráveis, como o desenvolvimento de constipação (LABUZ; MACHELSKA, 2013) e lesões gástricas (BURGESS; WILLIAMS, 2010), respectivamente. Neste estudo, foi investigada a ação do óleo de *Copaifera officinalis* sobre o trânsito gastrointestinal e não foi observada alteração neste parâmetro em camundongos, e o controle positivo do teste (morfina), causou redução significativa neste parâmetro. Isso se dá porque os receptores para morfina, que estão presentes no trato intestinal, quando ativados conduzem a um retardamento do movimento peristáltico, e também há uma diminuição das secreções gástrica, biliar e pancreática, causando conseqüentemente à constipação, sendo um efeito adverso comum para demais opioides (CAMILLERI, 2011; STEIN, 2016; TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUTT, [s.d.]). A administração oral do óleo de *Copaifera officinalis* também não casou indução aguda de lesões na mucosa gástrica.

Desta maneira, com os resultados do presente estudo podemos concluir que o óleo de *Copaifera officinalis* em modelos pré-clínicos de dor aguda e crônica em camundongos apresentou eficácia, o que se sugere a possibilidade de o mesmo conter compostos que estariam agindo como antagonistas do receptor TRPV1. Assim óleo pode ser considerado como uma possível alternativa de tratamento com ação anti-inflamatória e analgésica em patologias dolorosas.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se considerar que no modelo pré-clínico de dor aguda causado por exposição ao calor nocivo o óleo de *Copaifera officinalis* apresentou efeito antinociceptivo, comportando-se de forma semelhante a um antagonista TRPV1.

No teste de nocicepção induzido pela injeção intraplantar de capsaicina, óleo de *Copaifera officinalis* apresentou efeito antinociceptivo e antiedematogênico, desta maneira apresentou capacidade de ação semelhante ao antagonista TRPV1 neste teste, mostrando uma redução da nocicepção e do edema.

O tratamento com o *Copaifera officinalis* apresentou também efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo pré-clínico de dor inflamatória crônica causada pela administração intraplantar de adjuvante Completo de Freund (ACF) em camundongos. Estes efeitos corroboram com o uso popular de preparações desta planta para doenças inflamatórias e mostram a possibilidade do uso destas preparações para o tratamento de patologias dolorosas crônicas de origem inflamatória.

A administração do óleo de *Copaifera officinalis* não provocou alteração na atividade locomotora ou na temperatura corporal. Dessa forma, estas preparações não estariam apresentando efeito antinociceptivo devido à ação sedativa ou relaxante muscular, além de que não causou hipertermia, um efeito adverso relevante para compostos antagonistas do receptor TRPV1. Assim como também não induziu alterações a nível renal no soro dos animais, mostrando a sua segurança para o estudo em ensaios clínicos e também não causou alteração no trânsito gastrointestinal nos animais ou atividade ulcerogênica, efeitos adversos frequentes observados para compostos com propriedades analgésicas.

Concluindo, todas estas evidências suportam as propriedades antinociceptivas do óleo de *Copaifera officinalis*, e possivelmente estes efeitos sejam causados pela ação de compostos presentes nestas preparações que agem como antagonista do receptor TRPV1. Este estudo corrobora para demonstrar o efeito antinociceptivo da planta medicinal conhecida popularmente copaíba (*Copaifera officinalis*) que apresenta indicações para inflamações e alívio de patologias dolorosas relacionadas. Dessa maneira, o desenvolvimento de produtos para o

tratamento de patologias dolorosas através de compostos isolados desta planta seria interessante.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, M. A. et al. Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. **The Journal of clinical investigation**, 6 jun. 2016.
- ALENCAR, J. DA C.; ALENCAR, J. DA C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. IV. Interpretação de dados fenológicos em relação a elementos climáticos. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 3-4, p. 199–209, 1988.
- ALMEIDA, T. P. et al. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária – revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107–118, 2015.
- AMAYA, F. et al. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. **Brain research**, v. 963, n. 1-2, p. 190–6, 14 fev. 2003.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189–204, fev. 2012.
- BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 194, p. 3–30, 2009.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–84, 16 out. 2009.
- BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1141–9, 28 jun. 2013.
- BURGESS, G.; WILLIAMS, D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3753–9, nov. 2010.
- CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy research: PTR**, v. 14, n. 6, p. 401–18, set. 2000.
- CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179–208, maio 2005.
- CAMILLERI, M. Opioid-Induced Constipation: Challenges and Therapeutic Opportunities. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, 2011.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–24, 23 out. 1997.
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, n. 6966, p. 517–24, 4 dez. 2003.

CODERRE, T. J.; WALL, P. D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain**, v. 28, n. 3, p. 379–393, mar. 1987.

CORTRIGHT, D. N.; SZALLASI, A. TRP channels and pain. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 15, p. 1736–49, 2009.

DA SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. **Revista Dor**, v. 12, n. 2, p. 138–151, jun. 2011.

DANIEL L MEDEIROS, T. E. V. L. F. K. S. A. T. B. S. M. L. H. F. J. P. R. S. C. Study of copaiba oil on behavioral testing in rodent models by inducing neuropathic and inflammatory pain. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v. 4, n. 3, p. 194–200, 2014.

DAVIES, K. J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB life**, v. 50, n. 4-5, p. 279–89, [s.d.].

DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183–7, 11 maio 2000.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 20, p. 441–62, jan. 1980.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–72, nov. 2010.

EVANGELISTA, S. Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 373–5, 2015.

FRANCOIS, A. et al. State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca_v3.2 selectivity and support analgesic effects. **Pain**, v. 154, n. 2, p. 283–93, fev. 2013.

GAVVA, N. R. et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, v. 136, n. 1-2, p. 202–10, maio 2008.

GHOSH, R.; ALAJBEGOVIC, A.; GOMES, A. V. NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 536962, 2015.

GOMES, N. DE M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–83, 2 mar. 2010.

HELYES, Z. et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. **Arthritis and rheumatism**, v. 50, n. 5, p. 1677–85, maio 2004.

HENZE, D. A.; URBAN, M. O. **Large Animal Models for Pain Therapeutic Development**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2010.

HOFFMEISTER, C. et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 53, n. 2, p. 240–9, fev. 2014.

HONORE, P. et al. Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. **Pain**, v. 142, n. 1-2, p. 27–35, mar. 2009.

JARA-OSEGUERA, A.; SIMON, S. A.; ROSENBAUM, T. TRPV1: on the road to pain relief. **Current molecular pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 255–69, nov. 2008.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 29, p. 355–84, 2013.

KILKENNY, C. et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7824, jan. 2009.

KING, N. B.; FRASER, V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. **PLoS medicine**, v. 10, n. 4, p. e1001411, 2013.

LABIANCA, R. et al. Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain. **Clinical drug investigation**, v. 32 Suppl 1, p. 53–63, 22 fev. 2012.

LABUZ, D.; MACHELSKA, H. Stronger antinociceptive efficacy of opioids at the injured nerve trunk than at its peripheral terminals in neuropathic pain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 346, n. 3, p. 535–44, set. 2013.

LAING, R. J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 22, n. 2, p. 171–87, abr. 2016.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–7, 31 jul. 2008.

LOWIN, T.; PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 mesylate decreases the production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by activating CB2, TRPV1, TRPA1 and yet unidentified receptor targets. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 13, p. 15, 2016.

LUO, J. et al. Erratum to: Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 18, p. 3587–8, set. 2015.

MACPHERSON, L. J. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for**

Neuroscience, v. 27, n. 42, p. 11412–5, 17 out. 2007.

MAGISTRETTI, M. J.; CONTI, M.; CRISTONI, A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, n. 5, p. 686–90, maio 1988.

MALEK, N. et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 65, p. 1–10, mar. 2015.

MCGARAUGHTY, S. et al. Contributions of central and peripheral TRPV1 receptors to mechanically evoked and spontaneous firing of spinal neurons in inflamed rats. **Journal of neurophysiology**, v. 100, n. 6, p. 3158–66, dez. 2008.

MCGARAUGHTY, S. et al. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. **Molecular Pain**, v. 6, n. 1, p. 14, 2010.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525–30, 14 ago. 2007.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 577–581, jun. 2009.

MEOTTI, F. C.; LEMOS DE ANDRADE, E.; CALIXTO, J. B. TRP modulation by natural compounds. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 223, p. 1177–238, 2014.

MILANO, J. et al. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. **Life sciences**, v. 83, n. 21-22, p. 739–46, 21 nov. 2008.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–807, out. 2011.

MITTELSTADT, S. W. et al. Capsaicin-induced inhibition of platelet aggregation is not mediated by transient receptor potential vanilloid type 1. **Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 23, n. 1, p. 94–7, jan. 2012.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 272, p. re3, 22 fev. 2005.

MONTELL, C. The history of TRP channels, a commentary and reflection. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 461, n. 5, p. 499–506, maio 2011.

MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L. Letter to the Editor A Unified Nomenclature for the

Superfamily of TRP Cation Channels. **Molecular Cell**, v. 9, p. 229–231, 2002.

NEACSU, C. et al. Substance MCS-18 isolated from *Helleborus purpurascens* is a potent antagonist of the capsaicin receptor, TRPV1, in rat cultured sensory neurons. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 59, n. 2, p. 289–98, 2010.

NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 507–14, nov. 2006.

NETO, J. D. S. L.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Quimica Nova**, 2008.

NGUELEFACK, T. B. et al. TRPV1 channel inhibition contributes to the antinociceptive effects of *Croton macrostachyus* extract in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 293, 2015.

NOGUEIRA, E. DE O. et al. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) na proliferação celular in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 293, 22 fev. 2013.

OGNYANOV, V. I. et al. Design of potent, orally available antagonists of the transient receptor potential vanilloid 1. Structure-activity relationships of 2-piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 12, p. 3719–42, 15 jun. 2006.

PAL, M. et al. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 9, p. 1008–26, 2009.

PEPPIN, J. F.; PAPPAGALLO, M. Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: a review. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 7, n. 1, p. 22–32, jan. 2014.

PETER-SZABO, M. et al. Quantitative characterization of a repeated acute joint inflammation model in rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 5-6, p. 520–6, [s.d.].

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, n. 4, p. 465–472, 2009.

PINTO, A. A. DA C.; PINTO, A. A. DA C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, 2003.

RIES, C. R. et al. QX-314 Produces Long-lasting Local Anesthesia Modulated by Transient Receptor Potential Vanilloid Receptors in Mice. **Anesthesiology**, v. 111, n. 1, p. 122–126, jul. 2009.

ROSSATO, M. F. et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 544–51, 15 mar. 2011.

SAKURADA, T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 12, p. 1279–85, dez. 1992.

SAULINO, M.; KIM, P. S.; SHAW, E. Practical considerations and patient selection for intrathecal drug delivery in the management of chronic pain. **Journal of pain research**, v. 7, p. 627–38, 2014.

SCHAIBLE, H.-G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 5, p. 470, 2014.

SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 10, n. 3, p. 185–200, 2010.

SILVA, M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Aloe saponaria Haw on thermal injury in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 393–401, 7 mar. 2013.

SIMONE, D. A.; BAUMANN, T. K.; LAMOTTE, R. H. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. **Pain**, v. 38, n. 1, p. 99–107, jul. 1989.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais por que estudar chás medicinais e fitoterápicos? **Infarma**, v. 16, p. 13–14, 2005.

SOFOWORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 10, n. 5, p. 210–29, 2013.

STEIN, C. Opioid Receptors. **Annual review of medicine**, v. 67, p. 433–51, 2016.

SZABÓ, A. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 314, n. 1, p. 111–9, jul. 2005.

TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, abr. 2004.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531–43, set. 1998.

TREVISAN, G. et al. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. **The**

Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 343, n. 2, p. 258–69, nov. 2012.

TRIVEDI, M.; SHAIKH, S.; GWINNUTT, C. TUTORIAL DE ANESTESIA DA SEMANA FARMACOLOGIA DOS OPIIDES (PARTE 2). [s.d.].

UCHYTILOVA, E.; SPICAROVA, D.; PALECEK, J. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. **Molecular pain**, v. 10, p. 67, 2014.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. v. 37, n. 1, p. 123–126, 2007.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. **O Gênero *Copaifera* L.** *Química Nova*, 2002.

VERANO, J. et al. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 110, p. 255–64, set. 2013.

WANG, C. et al. Mother root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux exerts antinociceptive effect in Complete Freund's Adjuvant-induced mice: roles of dynorphin/kappa-opioid system and transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. **Journal of translational medicine**, v. 13, p. 284, 2015.

WESSELDIJK, F. et al. Increased plasma glutamate, glycine, and arginine levels in complex regional pain syndrome type 1. **Acta anaesthesiologica Scandinavica**, v. 52, n. 5, p. 688–94, maio 2008.

WONG, G. Y.; GAVVA, N. R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 267–77, abr. 2009.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–4, nov. 2010.

XIA, R. et al. TRPV1 signaling: mechanistic understanding and therapeutic potential. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 17, p. 2180–91, 2011.

YU, L. et al. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. **Molecular pain**, v. 4, p. 61, 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–10, jun. 1983.

ANEXO

ANEXO – Certificado do CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da ação analgésica e anti-inflamatória do óleo extraído do caule de *Copaifera officinalis* L" Protocolo nº.051/2015-1 sob a responsabilidade de Gabriela Trevisan dos Santos e equipe: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro, 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 no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 05/05/2015.

Vigência do Projeto	07/05/2015 à 30/03/2016
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> – camundongo - linhagem Swiss
Nº. De animais	318
Peso/idade	25-30g / 60 dias
Sexo	159 F / 159 M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 051/2015-1


Principal Investigator: Gabriela Trevisan dos Santos

Researchers: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro

Project title: Avaliação da ação analgésica e anti-inflamatória do óleo extraído do caule de *Copaifera officinalis* L

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 05 de maio de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA