



Universidade Federal do Ceará

**FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da
Copaifera langsdorffii Desf. (COPAÍBA) e de seu
constituente diterpênico Ácido Kaurenóico nos modelos
experimentais de inflamação intestinal**

LAURA ANDRÉA FARIAS PAIVA

**FORTALEZA-CEARÁ
2004**



Universidade Federal do Ceará

**FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da
Copaifera langsdorffii Desf. (COPAÍBA) e de seu
constituente diterpênico Ácido Kaurenóico nos modelos
experimentais de inflamação intestinal**

LAURA ANDRÉA FARIAS PAIVA

**Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal
do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

**FORTALEZA-CEARÁ
2004**



Universidade Federal do Ceará

FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Laura Andréa Farias Paiva

Data da Defesa: 26-11-2004

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Profa. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

Profa. Dra. Salete Maria da Rocha Sipriano Brito

SAGA DA AMAZÔNIA

*Era uma vez na Amazônia a mais bonita floresta
mata verde, céu azul, a mais imensa floresta
no fundo d'água as Iaras, caboclo lendas e mágoas
e os rios puxando as águas...*

*...aqui termina essa história para gente de valor
pra gente que tem memória, muita crença, muito amor
pra defender o que ainda resta, sem rodeio, sem aresta
era uma vez uma floresta na Linha do Equador...*

Vital Farias

A Deus, que dá sentido a tudo.
Ao Professor Vietla Satyanarayana Rao, que na convivência de
todos estes anos soube tudo sobre mim e mesmo assim
continuou meu amigo.
Aos meus pais José Bonifácio de Paiva (*in memoriam*) e Maria
do Socorro Farias Piava, aos quais devo tudo que sou.
Aos meus irmãos Joana, Boni e Francisco e sobrinhos, fontes
de amor, apoio e compreensão.
Ao Maurício que muitas vezes me tirou dessa jornada e me
ensinou a viver o agora.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Vietla Satyanarayana Rao**, meu orientador, por seus ensinamentos, dedicação, competência científica, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao professor **Edilberto Silveira**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica desta Universidade, pelo fornecimento do material, objeto de estudo deste trabalho, o óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e do Ácido Kaurenóico.

A amiga **Adriana da Rocha Tomé**, pela colaboração nos trabalhos de análise histológica.

As amigas **Adriana Rolim, Luilma e Regilane** pela companhia e ajudas nas intermináveis doasagens de “malon, mielo e catalase” e pela amizade e força em todos os momentos.

As amigas **Arlândia e Flávia** pela colaboração neste trabalho.

Aos **bolsistas de iniciação científica** e amigos, pois afinal “a culpa sempre é do bolsista”.

À todos os **funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia**.

Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	X
Lista de figuras.....	XI
Lista de quadros.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
 1. INTRODUÇÃO	 01
1.1. Caminhos da fitoterapia	02
1.2. A flora brasileira	06
1.3. Riqueza ameaçada	12
1.4. Gênero <i>Copaifera</i> e o óleo de copaíba	19
1.5. Histórico e aplicações do óleo de copaíba	26
1.6. Compostos detectados no gênero <i>Copaifera</i>	38
1.7. Atividade farmacológica do gênero <i>Copaifera</i>	42
1.8. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)	47
1.8.1. Doença de Crohn	48
1.8.2. Colite ulcerativa	49
1.8.3. Espécies reativas de oxigênio e as DIIS	51
1.8.4. Antioxidantes derivados de plantas	54
1.9. Isquemia	56
1.10. Permeabilidade intestinal	58
1.11. Cicatrização	59
2. OBJETIVOS	63
2.1. Objetivo geral	64
2.2. Objetivos específicos	64
3. MATERIAL	65
3.1. Animais	66
3.2. Drogas, reagentes e corantes	66
3.3. Equipamentos	68
3.4. Material botânico	68

4. MÉTODOS	70
4.1 Análise fitoquímica do óleo-resina da <i>Copaífera langsdorffii</i> Desf.	71
4.1.1. Estudo espectrométrico de RMN	71
4.1.2. Estudo cromatográfico	71
4.1.3. Estudo da fração volátil	71
4.1.4. Identificação do Ácido Kaurenóico	71
4.1.5. Isolamento do Ácido Kaurenóico	71
4.2. Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos (MASCOLO <i>et al.</i> , 1995)	72
4.3. Colite ulcerativa induzida por TNB (ácido trinitrobenzeno sulfônico) em ratos MORRIS <i>et al.</i> , 1989	74
4.4. Injúria intestinal induzido por iskemia-reperfusão em ratos. (KIMURA <i>et al.</i> , 1998)	75
4.5. Inflamação intestinal induzido por indometacina em ratos. (RUH <i>et al.</i> , 1998)	76
4.6. Aumento na permeabilidade induzido por indometacina (LANGE & DELBRO, 1995)	77
4.7. Atividade cicatrizante	78
4.7.1. Ferida aberta (MORTON & MALON, 1972)	78
4.7.2. Ferida por incisão (UDUPA <i>et al.</i> , 1994)	79
4.8. Ensaio para atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) KRAWISZ <i>et al.</i> , 1984	80
4.9. Ensaio para dosagem de Malonaldeído (MDA) (UCHIYAMA & MIARA, 1978)	82
4.10. Dosagem do nitrito (CHEN <i>et al.</i> , 2000)	83
4.11. Dosagem de catalase (BEERS & SIZER, 1952)	84
4.12. Determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos SH-NP (Glutational) (BOYD <i>et al.</i> , 1979)	85
4.13. Avaliação histopatológica	86
4.14. Análises estatísticas	87
5. RESULTADOS	88
5.1. Análise fitoquímica do óleo-resina da <i>Copaífera langsdorffii</i> Desf.	89

5.2. Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos	94
5.3. Colite ulcerativa induzida por TNB (ácido trinitrobenzeno sulfônico) em ratos	106
5.4. Injúria intestinal induzido por isquemia-reperfusão em ratos.	112
5.5. Toxicidade intestinal induzida por indometacina em ratos.	119
5.6. Permeabilidade intestinal com azul de Evans em camundongos	124
5.7. Atividade cicatrizante	126
5.7.1. Ferida aberta	126
5.7.2. Ferida por incisão	126
6. DISCUSSÃO	130
7. CONCLUSÃO	145
8. BIBLIOGRAFIA	147
9. PUBLICAÇÕES	184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies que já sofreram biopirataria	14
Tabela 2 – Indicações etnofarmacológicas dos óleos de copaíba encontradas na literatura	32
Tabela 3 – Efeito do óleo resina da <i>Copaifera langsdoffii</i> e ácido kaurenóico na avaliação induzida por ácido acético em ratos	95
Tabela 4 – Efeito do óleo resina da <i>Copaifera langsdoffii</i> na avaliação de escore e peso úmido em modelo de colite ulcerativa induzida por TNB em ratos	107
Tabela 5 – Efeito do óleo resina da <i>Copaifera langsdoffii</i> e ácido kaurenóico na avaliação da permeabilidade intestinal no modelo de azul de Evans em camundongos	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração medieval mostrando o manjerição, que tinha efeito principal de purificar o sangue conforme afirma o Tacuinum Sanitatis, de Viena	04
Figura 2 – Página de título da História Naturalis Brasiliae de Willem Piso e MacGrave (Amsterdam, 1648), obra que, precedida pela História Plantarum Novae Hispaniae de Francisco Hernandez constitui-se em valiosa informação sobre história natural, medicina, observações meteorológicas, usos e costumes do novo continente	07
Figura 3 – Mostra o mapeamento das regiões onde espécies do gênero <i>Copaifera</i> foram encontradas	21
Figura 4 – Cromatograma típico de óleos de copaiba	39
Figura 5 – Numeração e estereoquímica normal dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B	42
Figura 6 – Foto da <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Leguminosae)	69
Figura 7 – Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	97
Figura 8 – Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico sobre a atividade da mieloperoxidase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	98
Figura 9 – Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	99
Figura 10 – Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico sobre a dosagem de malonaldeído, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	100
Figura 11 – Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	101

Figura 12 – Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos	102
Figura 13 – Efeito do óleo-resina da Copaíba na colite induzida por ácido acético	103
Figura 14 – Efeito do Ácido Kaurenóico na colite induzida por ácido acético	104
Figura 15 – Foto mostrando a lesão causada no cólon no modelo de colite induzida por ácido acético	105
Figura 16 – Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos	108
Figura 17 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos	109
Figura 18 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos	110
Figura 19 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos	111
Figura 20 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 24, 12 e 2 horas antes da indução da iskemia-reperfusão em intestino de ratos	113
Figura 21 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 24, 12 e 2 horas antes da indução da iskemia-reperfusão em intestino de ratos	114
Figura 22 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 24, 12 e 2 horas antes da indução da iskemia-reperfusão em intestino de ratos	115

Figura 23 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 24, 12 e 2 horas antes da indução da iskemia-reperfusão em intestino de ratos	116
Figura 24 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a diminuição de grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP) na iskemia-reperfusão em intestino de ratos	117
Figura 25 – Efeito da administração oral o óleo-resina da Copaíba iskemia-reperfusão em intestino de ratos	118
Figura 26 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos	120
Figura 27 – Efeito da administração oral do Ácido Kaurenóico sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos	121
Figura 28 – Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestinos ratos	122
Figura 29 – Efeito da administração oral do Ácido Kaurenóico sobre a dosagem do nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestinos ratos	123
Figura 30 – Efeito do óleo-resina da <i>Copaifera langsdoffii</i> (ORCL) na contração da pele no modelo de ferida aberta	127
Figura 31 – Efeito do óleo-resina da <i>Copaifera langsdoffii</i> (ORCL) na contração da pele no modelo de ferida aberta	128
Figura 31 – Foto de animais que foram submetidos ao modelo de ferida aberta por incisão	129

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estrutura química de constituintes isolados do óleo-resina da <i>Copaifera langsdorffii</i>	92
Quadro 2 – Constituintes químicos identificados no óleo essencial do óleo-resina da <i>Copaifera langsdorffii</i>	93

RESUMO**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO-RESINA DA *Copaifera langsdorffii* DESF. (COPAÍBA) E DE SEU CONSTITUINTE DITERPÊNICO ÁCIDO KAURENÓICO NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL.**

Laura Andréa Farias Paiva, esta tese foi submetida como requisito necessário à obtenção do grau de Doutor no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. Orientador: Vietla Satyanarayana Rao.

O óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (Leguminaceae) é utilizado popularmente no tratamento de processos inflamatórios e na cicatrização de feridas e úlceras. Estudos prévios estabeleceram as propriedades gastroprotetora e antiinflamatória em modelos animais. O presente estudo avaliou o potencial antiinflamatório do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) e de seu constituinte diterpênico, ácido kaurenóico (AK) nos modelos experimentais de colite induzida por ácido acético (UC-AA), por ácido trinitrobenzênico sulfônico (UC-TNBS), e ainda, indometacina e isquemia-reperfusão induzindo inflamação intestinal (II-IND e II-I/R). E também, o potencial de cicatrização de feridas foi avaliado em ratos com feridas abertas e com incisão. Ratos foram pré-tratados via oral (15 e 2 horas antes) ou retal 2 horas após a indução da colite, com ORCL (200 e 400mg/Kg), AK (50 e 100mg/Kg) ou veículo (1mL, 2% Tween 80 ou 1mL, 2% DMSO). A colite foi induzida pela aplicação de 2mL de ácido acético 4% (v/v) ou TNBS (0,25 mL com 20mg) e 24 ou 72 horas depois, os danos na mucosa do cólon foram avaliados, medidos os níveis de mieloperoxidase e malonaldeído. No modelo de (CU-AA), houve uma importante redução no escore da lesão e peso úmido nos animais tratados com as substâncias teste, quando comparado ao controle veículo. Os efeitos foram confirmados na bioquímica pela significativa redução da atividade da mieloperoxidase (MDA), o marcador da infiltração de neutrófilos e pela marcada diminuição nos níveis de malonaldeído, um indicador da lipoperoxidação. Além de o ácido acético aumentar os níveis de nitrito e da enzima catalase no cólon, onde o tratamento com ORCL diminuiu significativamente. A análise microscópica revelou uma diminuição da infiltração de células inflamatórias e do edema da submucosa, nos segmentos do cólon tratados com ORCL ou AK. De maneira similar, no modelo de UC-TNBS, houve uma redução do escore da lesão e peso úmido do cólon de animais pré-tratados com ORCL (400mg/Kg, v.o. ou retal) 2, 24 e 48 horas após a injeção intracolônica de TNBS. A atividade da MPO, mas não MDA e catalase foram significativamente afetados pelo pré-tratamento com ORCL. As observações histológicas indicam uma proteção parcial do ORCL, como UC-TNBS é um modelo crônico, talvez houvesse necessidade de uma terapia mais prolongada. No modelo de II-I/R, quarenta e cinco minutos de isquemia seguida de uma hora de reperfusão da artéria mesentérica superior causou significativo aumento nos níveis de MPO, catalase, MDA e nitrito, com uma significativa diminuição dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH/GSH) indicando um estresse oxidativo. Estes valores foram significativamente revertido pelo pré-tratamento via oral com ORCL (200 e 400mg/Kg), sugerindo que ORCL anula o estresse oxidativo. Animais pré-tratados com ORCL (200 e 400mg/Kg, v.o.) ou AK (100mg/Kg, v.o.), 12 e 2 horas antes da administração de 20mg/Kg de indometacina causando toxicidade intestinal, foi capaz de ser evidenciado pela diminuição nos níveis de MPO e nitrito. Diferente da indometacina, ORCL mas não AK falharam em induzir o aumento significativo na permeabilidade intestinal. Este efeito do ORCL foi similar ao inibidor seletivo de COX-2, rofecoxibe. Estas observações sugerem que ORCL é isento de toxicidade intestinal diferente da toxicidade intestinal dos inibidores clássicos não seletivos da COX. Além disso, ORCL promove cicatrização de feridas aberta ou com incisão em ratos evidenciada pela contração e tensão da pele. Os dados indicam um potencial antiinflamatório do óleo-resina da copaíba e do seu diterpeno ácido kaurenóico, possivelmente mediado pelos mecanismos antioxidantes e anti-lipoperoxidativo.

ABSTRACT**STUDIES ON THE ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF COPAIBA OIL-RESIN FROM *COPAIFERA LANGSDORFFII* AND ITS DITERPENE CONSTITUENT KAURENOIC ACID IN EXPERIMENTAL MODELS OF INTESTINAL INFLAMMATION.**

Laura Andréa Farias Paiva, thesis submitted in partial fulfillment for the award of Degree in Doctor of Philosophy in Pharmacology, Post Graduate Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. Advisor: Vietla Satyanarayana Rao.

Copaiba oil-resin from *Copaifera langsdorffii* (Leguminaceae) is a reputed traditional remedy for the treatment of inflammatory conditions and to promote healing of ulcers and wounds. Previous studies established its anti-inflammatory and gastroprotective properties through animal experimentation. The present study extended these earlier studies to analyse the intestinal anti-inflammatory potential of oil-resin *Copaifera langsdorffii* (ORCL) and its diterpene constituent, kaurenoic acid (KA) in rat models of ulcerative colitis induced by acetic acid (AA-UC), and trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS-UC), and in indomethacin - and ischemia-reperfusion-induced intestinal inflammation (IND-II and I/R-II). Further, its wound healing potential was evaluated in rats on open and incision wounds. Rats were pretreated orally (15 hrs and 2 hrs before) or rectally 2 hrs before the induction of colitis with ORCL (200 and 400 mg/kg), KA (50 and 100 mg/kg) or vehicle (1 ml, 2% Tween 80 or 1 ml, 2% DMSO). Colitis was induced by intracolonic instillation of a 2 ml of 4% (v/v) acetic acid solution or TNBS (0.25 ml of 20 mg) and 24 hrs or 72 hrs later, the colonic mucosa was analysed for the severity of macroscopic colonic damage, the myeloperoxidase and the malondialdehyde levels. In AA-UC model, a marked reduction in Gross damage score and in wet weight/length ratio of colonic tissue were evident in animals pretreated orally or rectally with test substances, as compared to vehicle alone-treated controls. This effect was confirmed biochemically by a significant reduction in colonic myeloperoxidase (MPO) activity, the marker of neutrophilic infiltration and by a marked decrease in malondialdehyde (MDA) level, an indicator of lipoperoxidation. Besides, AA elevated increase in the levels of nitrite and catalase activity in colon tissue was also significantly decreased by ORCL treatment. Furthermore, microscopical examination revealed the diminution of inflammatory cell infiltration, and the submucosal edema in colon segments of rats pretreated with ORCL or KA. In a similar manner, in TNBS-UC, a marked reduction in Gross damage score and in wet weight/length ratio of colonic tissue was evident by ORCL pretreatment (400 mg/kg, p.o. or intra-rectal) at 2, 24 and 48 hrs after intracolonic injection of TNBS. MPO activity but not the MDA and catalase levels were significantly affected by ORCL treatment. Histological observations also indicated only a partial protection by ORCL, suggesting that TNBS-UC being a chronic model, a more prolonged therapy may be needed. In the model of I/R-II, five forty minute of ischemia followed by one hour reperfusion of superior mesenteric artery caused significant elevations of MPO, catalase, MDA and nitrite levels with a significant decrease in non-protein sulfhydryls (NP-SH/ GSH) indicating an oxidative stress. These changes were significantly reversed by oral pretreatment with ORCL (200 and 400 mg/kg), suggesting that ORCL obliterates oxidative stress. Pretreatment of animals with ORCL (200 and 400 mg/kg, p.o.) or KA (100 mg/kg, p.o.), 12 and 2 hrs before the administration of 20 mg/kg indomethacin mitigated the intestinal toxicity as evidenced by decreases in tissue levels of MPO and nitrite. Unlike indomethacin, ORCL but not KA at either dose failed to induce a significant increase in intestinal permeability. This effect of ORCL simulated that of a selective COX-2 inhibitor, rofecoxib. These observations suggest that ORCL is devoid of intestinal toxicity unlike the classical non-selective COX inhibitors. Also, ORCL promoted wound healing in rats on experimental open or incision wounds as evidenced by an early wound contraction and increased wound tensile strength. The data indicate a significant anti-inflammatory potential of copaiba oil-resin and its diterpenoid, kaurenoic acid possibly mediated through an antioxidant/anti-lipoperoxidative mechanism(s).

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caminhos da Fitoterapia

As origens da Fitoterapia, assim como da Medicina, recuam até a mais remota Antiguidade. Relatos e tradições imemoriais – dos egípcios aos chineses ou dos gregos aos fenícios – já fazem menção às propriedades curativas das plantas, um poder que, ao longo dos séculos, independentemente do maior ou menor grau de civilização atingido por esses povos, esteve sempre associado ao sobrenatural e ao sagrado. A cura pelas plantas, na origem, repousa na crença de que a natureza é um grande reservatório de qualidades mágicas ou milagrosas, à espera de serem descobertas e utilizadas pelos homens; e essa crença reflete a convicção de que a capacidade de curar é um dom concedido pelos deuses a alguns mortais (NATURA, 2002).

O fato é que, para as civilizações da Antiguidade, a doença era concebida como castigo divino e, portanto, devia ser tratada por sacerdotes – guardiões dos segredos da cura, elos de ligação entre a divindade e os mortais. Mas, impregnados ou não de aura sobrenatural, existem muitos registros do uso de medicamentos fitoterápicos pelos antigos. A natureza não só fornecia alimento, mas era o “laboratório” no qual podiam ser encontradas as substâncias para todos os fins. Ainda que conhecessem muito superficialmente as características e propriedade das plantas, nossos antepassados as usavam em larga escala, com base na experiência empírica, observando, talvez, o uso que os animais instintivamente faziam delas.

Os egípcios estão entre os povos que mais colaboraram para sistematizar informações sobre práticas de cura a partir de plantas e resinas, sempre com grande apelo às suas implicações religiosas. Acreditavam que cada órgão do corpo era protegido por um deus e, assim, ao primeiro sinal de distúrbio, eram feitas oferendas à divindade correspondente. E igualmente se notabilizaram no preparo

de medicamentos – como ficou registrado no Papiro de Ébers (cerca de 1.500 a.C.) – indicado para diversos males, sempre associados a rituais religiosos.

Entre os egípcios, já há registros não só do uso analgésico do ópio, como também da utilização de fungos com propriedades antibióticas. Além disso, por acreditarem na continuidade da vida em outras dimensões, também desenvolveram muitas substâncias e técnicas especiais para conservação de cadáveres. Admite-se que a antiga tradição egípcia na manipulação desses produtos teria dado origem à própria palavra “química”, derivada de “kemi”, nome pelo qual o Egito era conhecido na Antiguidade, e que significa “terra vermelha”.

Outras civilizações, como a indiana e a chinesa, a grega e a romana, também deixaram extensas obras sobre o uso de plantas medicinais, de que é exemplo o livro indiano Sushruta-Samhita, com um inventário de 700 espécies. Já os chineses são responsáveis pela introdução do conceito de saúde como equilíbrio entre corpo e mente.

Na bíblia, já adentrando a cultura que nos é familiar, há várias citações de medicamentos de origem vegetal: a mandrágora, os bálsamos, as gomas e algumas essências. Da mesma forma, o Talmud – compilação das interpretações e comentários da lei oral judaica – descreve grande número de substâncias vegetais.

Mas é só com Hipócrates (460-370 a.C.) que vem a ser formulada, pela primeira vez, uma teoria que atribui causas naturais às doenças, por oposição às concepções divinas ou sobrenaturais. “Nenhuma doença é mais humana ou mais divina que as outras. Todas as doenças têm uma causa natural”, afirma ele em A Doença Sagrada. Considerado o “pai” da medicina no Ocidente, Hipócrates começou a liberar as práticas médicas de sua “aura” sagrada de origem, vindo a influenciar várias escolas filosóficas e científicas, com seguidores do peso de um Claudius Galenus (cerca de 130 a.C.).



FIGURA 1 – Ilustração medieval mostrando o manjericao, que tinha efeito principal de purificar o sangue conforme afirma o Tacuinum Sanitatis, de Viena.

Com o fim do Império Romano, a medicina então praticada entrou em decadência, fazendo renascer, sob a ótica do cristianismo, a concepção sagrada do corpo, da saúde e da doença. Ao longo da Idade Média, os conhecimentos científicos foram relegados a um plano inferior, chegando a ser considerados práticas satânicas e feitiçaria, sujeitos aos santos tribunais da Inquisição. A simples utilização de medicamentos contrapunha-se à fé cristã, de acordo com uma lógica peculiar: se a doença, a peste e a dor provinham de Deus, caberia então a Ele, e só a Ele, providenciar a cura. Por isso, os padres, recomendavam aos fiéis que, em caso de doença, recorressem aos santos, já que a cada um era atribuído a responsabilidade de encaminhar um tipo particular de cura.

Enquanto no Ocidente Medieval a Medicina científica evoluía muito precária e lentamente, no mundo árabe, tornado herdeiro do patrimônio médico das civilizações antigas, essa e outras ciências conheceram um desenvolvimento notável. Preservando a tradição clássica de judeus, gregos e romanos, os árabes foram os responsáveis por avanços significativos nos campos da química e da farmácia. Aos árabes é atribuída, por exemplo, a separação entre ciência médica e ciência farmacêutica; foi em Bagdá que surgiu, no século VIII, aquela que foi considerada a primeira farmácia da história. Muitas das inovações da técnica farmacêutica, de aparelhos e métodos, foram introduzidas pelos árabes. Exemplo célebre dessa contribuição são os tradicionais potes de farmácia, de faiança, adotados em todo o mundo nos séculos seguintes.

O conhecimento árabe começou a ser difundido na Península Ibérica já a partir do século IX, quando da invasão mulçumana, e teve grande impulso a partir do século XV, principalmente através dos judeus, então considerados os maiores detentores do saber médico árabe e greco-romano. Conhecedores das propriedades curativas das plantas, bem como de experiências alquímicas, os judeus também desempenharam importante papel no campo da medicina.

A profunda estagnação que o conhecimento médico havia experimentado na Europa medieval só foi interrompida no Renascimento e no período das

grandes navegações. Além dos fatores internos, que levaram à redescoberta da antiga sabedoria greco-latina, o contato com novas terras e culturas, no Mundo Novo, na África e na Ásia, foi um convite ao experimentalismo e às descobertas científicas.

Sem contar todo o impacto sócio-cultural, filosófico e econômico o Novo Mundo apresentou ao europeu uma biodiversidade jamais imaginada até então e, rapidamente, novas plantas, drogas e terapias foram-se somando ao arsenal médico europeu. Estudiosos passaram a se dedicar ao potencial da exuberante flora medicinal das terras descobertas, descrevendo suas características e propriedades. É o caso de Garcia da Orta, médico e naturalista português, que partiu para Índia em 1553, para se dedicar ao estudo das ervas da região – experiência de anos, da qual resultou sua obra máxima, *Colóquios dos simples e drogas e coisas medicinais da Índia*, verdadeira enciclopédia médico-botânica.

Graças a essa e outras iniciativas, similares, as plantas rapidamente tiveram grande aceitação na farmacologia européia, estimulando outros médicos e naturalistas a estudá-las, cada vez em maior profundidade.

1.2. A Flora Brasileira

Durante o século XVI, o Brasil não chegou a ser alvo de estudos de nenhum médico ou naturalista como Garcia da Orta, mas um bom trabalho de identificação e descrição da exuberante natureza brasileira foi inicialmente realizado, com critério, por jesuítas como Nóbrega e Anchieta. Observando a natureza e a forma como os indígenas preparavam alimentos e remédios, os padres repassavam informações à Metrópole e mesmo a outros colégios jesuíticos espalhados pelo império português, colaborando para divulgar os segredos da flora brasileira. Foram, assim, os primeiros responsáveis pela difusão dos conhecimentos da farmacologia indígena pelo mundo.

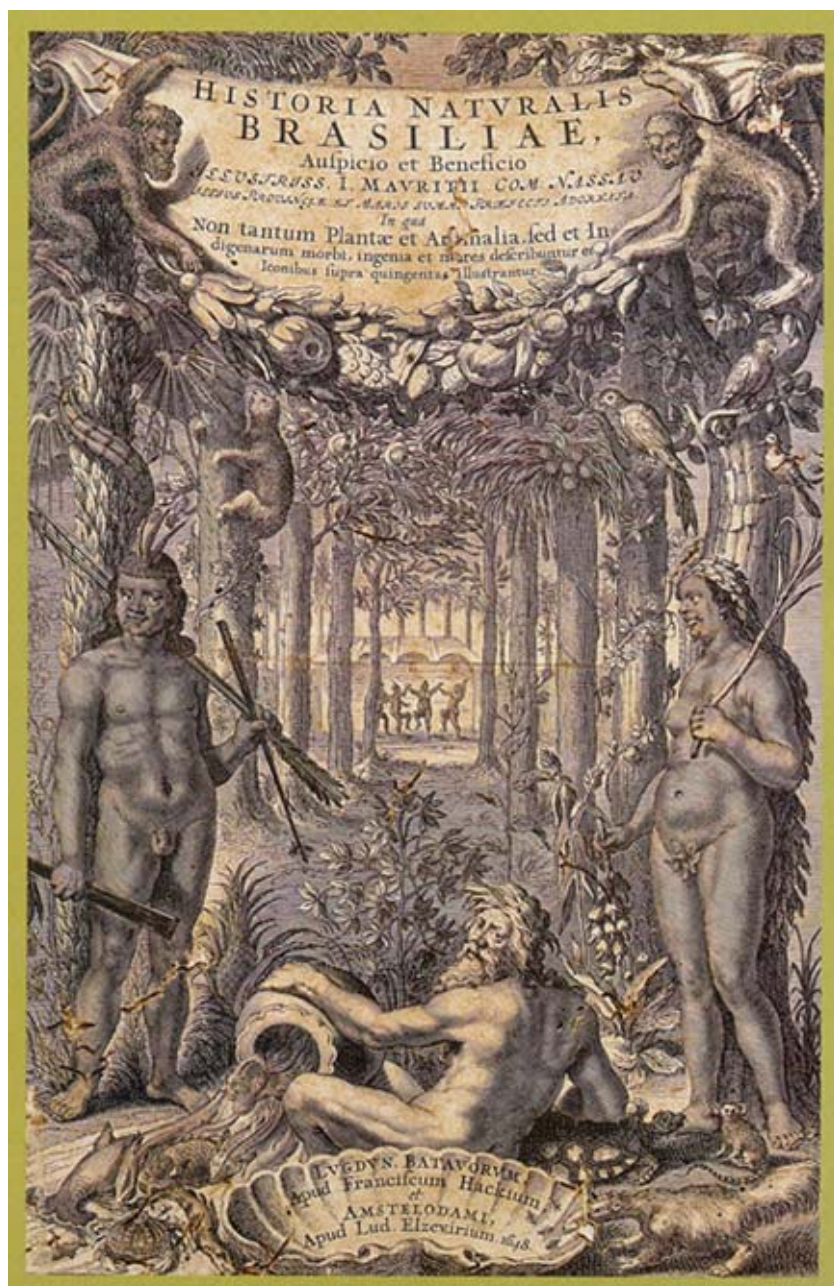


FIGURA 2 – Página de título da *Historia Naturalis Brasiliae* de Willem Piso e MacGrave (Amsterdam, 1648), obra que, precedida pela *Historia Plantarum Novae Hispaniae* de Francisco Hernandez constitui-se em valiosa informação sobre história natural, medicina, observações meteorológicas, usos e costumes do novo continente.

Mas não era só o interesse meramente especulativo que levava os jesuítas a estudar o poder curativo das plantas. Junto aos colégios, eles mantinham, entre oficinas, forjas e demais instalações voltadas à subsistência, boticas bem equipadas para atender aos enfermos – e essas boticas deram origem a muitos hospitais, como a Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro.

Em matéria de medicamentos, a preferência era pelos consagrados produtos europeus, boa parte dos quais, no entanto, sequer conseguia chegar intacta à Colônia, deteriorando-se na difícil e longa viagem. A necessidade, então, fez que grande parte do arsenal terapêutico das boticas dos jesuítas fosse sendo formado a partir de plantas medicinais indígenas.

Assim, muitos conhecimentos do Velho e do Novo Mundo iriam se amalgamar no Brasil-colônia, no que se refere ao uso de plantas medicinais e práticas de cura. A técnica, por exemplo, desenvolvida pelos portugueses, de utilizar a aguardente de cana para concentrar o poder curativo de certas ervas, foi reconhecida e utilizada pelos indígenas. No sentido inverso, práticas adotadas por pajés, como o uso do fogo e de brasas diretamente no corpo, para curar algumas moléstias, acabaram sendo aceitas e aplicadas pelos europeus. *Caminhos e Fronteiras*, do historiador Sérgio Buarque de Holanda, descreve esta e muitas outras formas como a cultura paulista se desenvolveu, a partir do convívio entre o elemento europeu e o índio.

Dessa mistura de culturas, hábitos e crenças, nasceu um tipo de medicina particular no Brasil-colônia. Para além da área de influência dos colégios jesuítas, os boticários e ervanários eram clandestinos, uma vez que apenas em 1960, por determinação das Ordenações Filipinas, seriam autorizados a funcionar como casas comerciais. Mas em face da escassez de cientistas e médicos, muitos dos chamados “empíricos” (curandeiros, raizeiros, pajés, parteiras e barbeiros) assumiam a missão de tratar doentes. Essas práticas foram objeto de análise dos primeiros naturalistas, que se dedicaram ao estudo sistemático da flora brasileira,

como os holandeses Piso e MacGrave, que vieram ao Brasil com Maurício de Nassau, entre 1648 e 1650.

Apesar da existência, desde o início, de estudos de caráter científico – incipientes, é verdade –, a prática médica pouco avançou no Brasil até o início do século XIX, quando a chegada da Corte portuguesa impôs várias transformações à Colônia, a fim de criar uma infraestrutura econômica e cultural compatível com a presença da Família real. Em 1808, dom João VI decretou a abertura dos portos brasileiros às nações amigas de Portugal, pondo fim ao pacto colonial; instalou ministérios, implantou Juntas de Comércio, Agricultura e Navegação; abriu a Biblioteca e a Imprensa Régia, assim como várias escolas, além de promover o intercâmbio com artistas e cientistas. Ainda em 1808, foram criados os estudos médicos no Hospital Militar da Bahia, em Salvador, dando início ao ensino oficial de Medicina, com ênfase em anatomia e cirurgia. No ano seguinte, foi fundada a Faculdade de Medicina no Rio de Janeiro, composta por várias cadeiras como Química, Matéria Médica e Farmácia.

Nessa época, destaca-se a figura de Freire Allemão, um dos poucos estudiosos da flora brasileira egressos da Faculdade Médica do Rio de Janeiro. Nascido na então capital do Império, Freire Allemão, filho de camponeses, logo depois de se formar, em 1833, especializou-se em Paris e, de volta, passou a lecionar botânica e zoologia na escola em que se formou. Tratou pessoalmente de dom Pedro II, sendo então nomeado médico da Imperial Comarca e, mais tarde, diretor do Museu Nacional. Dedicou parte de sua vida ao estudo das plantas, especialmente no Ceará, onde colheu mais de 20 mil amostras.

O reduzido incentivo dado à pesquisa não representava, porém, que a Corte portuguesa deixasse de se interessar pelo potencial da natureza brasileira. Mas esses estudos seriam realizados principalmente por estrangeiros – médicos botânicos e naturalistas vindo sobretudo da França, da Inglaterra e da Alemanha. Cientistas como Martius, Spix, Saint Hilaire, Eschwege, Derby, Goeldi ou Peckolt, e muitos outros, vieram ao Brasil em diferentes épocas e viajaram por todo o nosso

território. Alguns deles – é o caso de Martius – Dedicaram suas vidas a estudar especificamente a flora brasileira e produziram considerável obra sobre suas características, com entusiásticas análises das plantas de uso medicinal.

Enquanto estudiosos estrangeiros louvavam a diversidade e a enorme gama de aplicações da rica flora do Brasil, na Europa, durante o século XIX, desenvolviam-se paralelamente estudos farmacêuticos que buscavam a síntese orgânica, a fim de contrariar a tese predominante, segundo a qual os compostos orgânicos só podiam ser fabricados por organismos vivos. Em 1828, o alemão Friedrich Wöhler conseguiu a síntese da uréia, a partir de uma substância inorgânica, o cianato de amônio. A partir daí, diversas outras descobertas científicas começavam a mudar o perfil da indústria farmacêutica, que se sofisticaria cada vez mais, juntamente com a indústria química, transformando completamente o perfil da prática médica.

No Brasil a transição para a era dos medicamentos industrializados foi lenta, especialmente nas áreas menos urbanizadas do país. Nas grandes cidades, em particular no Rio de Janeiro, a industrialização da atividade farmacêutica era mais visível. Entre a segunda metade do século XIX e início do século XX, muitas das tradicionais boticas e farmácias transformaram-se em pequenos e médios laboratórios, onde conviviam as tradicionais práticas de manipulação com a produção em larga escala de tônicos, ungüentos, xaropes e produtos de “tucador”, cujas propriedades eram divulgadas, em singulares campanhas, em revistas e jornais, mas principalmente através dos famosos *almanacks* de farmácia. Muitas das fórmulas utilizadas na produção desses remédios guardavam ainda princípios fitoterápicos ou de origem animal, mas alguns deles já eram resultado da introdução de elementos sintéticos.

Foi nessa altura - final da Primeira Grande Guerra (1914-1918) - que o mundo enfrentou mais uma difícil luta contra um inimigo poderoso: a gripe espanhola. Considerada a primeira pandemia do mundo moderno, a *influenza*

atingiu dimensões globais em seis meses, causando a morte de 25 milhões de pessoas, em menos de dois anos entre 1918 e 1919.

Diante dos poucos recursos para combatê-la, a violência da gripe estimulou a atividade farmacêutica nos países mais industrializados, levando a um vigoroso crescimento e internacionalização, processo que passou a envolver investimentos cada vez maiores em pesquisa. A dimensão que a indústria farmacêutica atingiu no pós-guerra pode ser avaliada pelo fato de que a Alemanha, como parte das obrigações de guerra devidas aos Estados Unidos, teve de entregar a marca "Aspirina", medicamento desenvolvido pelo laboratório Bayer em 1897, que representava um dos maiores valores econômicos atingido por um remédio em toda a história.

A grande revolução da indústria farmacêutica, porém viria cerca de uma década depois. Em 1929, Alexander Fleming divulgava a descoberta daquela que seria considerada a "droga do século" - a penicilina. A prova de fogo do poder do antibiótico foi a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), quando graças à penicilina foi possível preservar a vida de milhares de soldados.

A partir daí, mais e mais investimentos em pesquisa e tecnologia intensificaram o desenvolvimento da biotecnologia e da indústria farmacêutica. A sofisticação não apenas dos medicamentos, mas principalmente dos recursos de diagnóstico e de intervenção cirúrgica, foi transformando por completo a prática médica nas grandes cidades. O hospital, antes destinado basicamente a pobres e indigentes, assumiu posição central na prestação de serviços à saúde, agrupando as diversas especialidades médicas e todo o equipamento e infra-estrutura necessários.

O ensino de Medicina, por sua vez, acompanhou a enorme evolução tecnológica, tanto em relação ao diagnóstico quanto às técnicas de tratamento, caminhando para a especialização cada vez mais acentuada. De um lado esse panorama ampliou as possibilidades de cura aumentando significativamente a

perspectiva de vida de boa parte da humanidade; de outro, a alta sofisticação da Medicina acabou por excluir a parte restante numerosa, sem recursos financeiros para desfrutar dos benefícios tecnológicos daí advindos.

Além da questão do difícil acesso à moderna Medicina ocidental, outro debate veio à tona nas últimas décadas do século XX. Em grande medida, a tecnologia "desumanizou" a prática médica: o corpo humano passou a ser visto como uma máquina, e a doença, como o mau funcionamento de um mecanismo biológico. E quando o tratamento da parte defeituosa compromete - o que não é raro - outras partes, estas também são tratadas isoladamente, sem relação com o conjunto.

Na medida em que se começou a questionar essa visão, novamente voltaram ao debate, tanto nacional como internacional, antigos valores e práticas médicas. Entre elas, ganharam novo impulso não só a medicina chinesa, cujo princípio fundamental é que a saúde depende do equilíbrio entre mente e corpo, mas também a Homeopatia e, principalmente, a Fitoterapia. Inserida numa visão compreensiva e abrangente, baseada na manutenção da saúde, enquanto princípio que se situa acima e além do combate à doença, a Fitoterapia volta revigorada e avalizada cientificamente como uma alternativa viável, inclusive economicamente, para o tratamento de distúrbios orgânicos, antes que estes se transformem em problemas mais sérios (NATURA, 2002).

1.3. Riqueza Ameaçada

Muitos anos antes das caravelas portuguesas fincarem suas âncoras por aqui, o Brasil estava longe de ser um paraíso tropical inabitado. Bem no coração da Amazônia, em Mato Grosso, onde hoje convivem 14 tribos indígenas no Parque Nacional do Xingu, havia uma civilização com avançado conhecimento de engenharia. As evidências arqueológicas, reveladas em setembro de 2003, mostraram vestígios de praças, ruas e pontes construídas por uma sociedade com cerca de cinco mil habitantes. Durante pelo menos 250 anos, esses povos resistiram

a toda sorte de ameaças, de malária e febre amarela a picadas de cobra e plantas venenosas. Para se curar, usavam infusões de ervas e poções feitas pelos pajés com ingredientes quase sempre secretos. Só 350 mil índios, ou 0,2% da população brasileira, resistiram às armas de fogo, ao domínio dos colonizadores e às doenças européias (MENCONI, 2003).

A população nativa diminuiu, mas a pilhagem das riquezas naturais brasileiras já dura 500 anos; Os colonizadores europeus que saqueavam as colônias deram lugar aos piratas disfarçados de turistas, pesquisadores ou missionários. Seu objetivo continua o mesmo; apropriar-se das riquezas da maior biodiversidade do mundo, úteis na produção de alimentos, remédios e cosméticos. A grilagem evoluiu a reboque da indústria farmacêutica e da biotecnologia. Um quarto dos atuais medicamentos industrializados é derivado de plantas, o que representa um mercado mundial de US\$ 14 bilhões ao ano, sendo US\$124 milhões só no Brasil (MENCONI, 2003).

O País amarga um prejuízo diário de US\$ 16 milhões com a biopirataria, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Há casos emblemáticos como o pau-brasil, a seringueira ou a fruta do bibiri, registrada pelo laboratório canadense Biolink, apesar de usada há gerações como anticoncepcional pelos índios uapixanas, de Rondônia. Uma empresa japonesa deixou mais evidente essa vulnerabilidade ao registrar como seus os nomes de frutas nacionais típicas como cupuaçu e acerola. O caso mais famoso, porém, é o do professor da faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Sérgio Ferreira, que descobriu no veneno da jararaca uma substância capaz de controlar a pressão arterial. Sem dinheiro para tocar as pesquisas, ele aceitou uma parceria com o laboratório americano Bristol-Myers Squibb. Em troca de recursos, a empresa registrou a patente do princípio ativo Captopril, um mercado que gera US\$ 2,5 milhões ao ano em royalties, e o Brasil também tem que pagar (MENCONI, 2003).

Não há páreo no mundo para a riqueza das florestas, pradarias e savanas brasileiras, que abrigam duas em cada cinco espécies de plantas e animais do planeta. Aqui vivem 55 espécies de primatas, dois quintos das aves e um décimo dos anfíbios e mamíferos do mundo. O grande dilema da exploração dos recursos naturais é o desconhecimento. A ciência já esquadrinhou quase 1,8 milhão de espécies de um total que pode variar entre cinco e 30 milhões. Por isso, a biopirataria muitas vezes passa despercebida. Na maioria dos casos, ela é reflexo da falta de fiscalização, de controle e de uma legislação que proteja a propriedade genética das espécies nativas (VER TABELA 1) (MENCONI, 2003).

TABELA 1 – Espécies que já sofreram biopirataria:

ACEROLA <i>Malpighia glabra</i> Linn	Rica em vitamina C, a fruta foi patenteada pela empresa japonesa Asahi Foods, que também registrou como sua propriedade o nome açaí. A bola da vez é o camu-camu, fruta avermelhada de gosto azedo campeã em vitamina C, que está na mira dos japoneses.
ANDIROBA <i>Carapa guianensis</i> Aubl	Usada pelos povos da Amazônia como repelente de insetos, contra febre e como cicatrizante. A Rocher Yves Vegetale registrou nos Estados Unidos, Europa e Japão a patente sobre a produção de cosméticos ou remédios que usem o seu extrato.
AYAHUASCA <i>Banisteriopsis caapi</i>	Cipó alucinógeno usado há quatro séculos em cerimônias religiosas de tribos indígenas e em rituais do Santo Daime. Foi patenteada pela empresa americana Internacional Plant Medicine Corp.
BIBIRI <i>Ocotea rodiei</i>	De sua semente é extraída a rupununina, substância patenteada pela Inglaterra para ser usada como anticoncepcional. O laboratório canadense Biolink registrou seu princípio ativo, empregado em medicamentos para Aids.
COPAÍBA <i>Copaifera sp</i>	É considerado o antibiótico das matas. Tem propriedades expectorantes, desinfetantes e estimulantes. A empresa Technico-flor S/A registrou patente mundial sobre cosméticos ou alimentos que utilizem a planta.

CUPUAÇU <i>Theobroma grandiflorum</i>	Considerada uma fruta exótica da Amazônia, ela foi patenteada pela Asahi Foods, que produz o cupulate, chocolate de cupuaçu. A empresa britânica The Body Shop patenteou o extrato da fruta para produção de cosméticos.
CURARE	Mistura de ervas guardada em sigilo pelos índios e usada na ponta da flecha como veneno para imobilizar a presa. Foi patenteada pelos EUA na década de 40 e é usado na produção de relaxantes musculares e anestésicos cirúrgico.
FÓSSEIS	O fóssil rara de uma planta de 130 milhões de anos foi anunciado na Suécia como uma grande descoberta. Só não se revelou que ele foi levado ilegalmente da Chapada do Araripe, no Ceará.
JARARACA <i>Bothrops jararaca</i>	Pesquisador brasileiro descobriu no veneno da cobra uma substância para controlar a hipertensão. O laboratório Bristol Myers-Squibb financiou a pesquisa e registrou o princípio ativo contra pressão alta, um mercado de US\$ 2,5 bilhões. O Brasil paga royalties, como o resto do mundo.
JARARACA ILHÔA <i>Bothrops insularis</i>	A cobra, que só existe na ilha da Queimada Grande, no litoral Sul de São Paulo, é considerada exótica e desperta interesse em colecionadores do mundo todo pela sua beleza e pelo poder de seu veneno, muito mais letal do que o das outras espécies de jararaca. Há dois anos, alguns exemplares da serpente foram encontrados à venda num mercado de animais em Amsterdam.
MOGNO <i>Swietenia macrophylla</i>	Em 40 anos de exploração, foram extraídos 2,5 milhões de árvores, avaliado em US\$ 4 bilhões. Dois terços da madeira mais valiosa do País vão para EUA e Inglaterra, nem todos pelo caminho da legalidade.
PAU-BRASIL <i>Caesalpinia echinata</i> lam	Os portugueses surrupiaram dos índios o segredo da extração do pigmento vermelho. Sobraram poucos exemplares para contar a história da árvore que deu nome ao Brasil.
PAU-ROSA	Desde a década de 30, seu óleo é usado como fixador de aroma nos EUA, Bélgica, França, Reino Unido e Alemanha. É a matéria-

<i>Aniba roseadora</i>	prima do perfume Chanel nº5 e corre risco de extinção.
QUEBRA-PEDRA <i>Phyllanthus niruri</i> Linn	Usada pelos índios para tratar problemas hepáticos e renais, foi patenteada por uma empresa americana para fabricação de medicamento para hepatite B.
SAPO <i>Epipedobetes tricolor</i>	O sapo que vive nas árvores da Amazônia possui uma toxina analgésica 200 vezes mais potente do que a morfina. O laboratório americano Abbott sintetizou a substância e vende a droga.
SERINGEIRA <i>Hevea brasiliensis</i>	Em 1876, o inglês Henry Wickham plantou sementes de seringueira em colônias britânicas na Malásia, que se tornou grande exportador e desbancou o Brasil, que passou a importar borracha.

FONTE: Revista ISTO É, 24 de setembro de 2003 nº 1773.

O carro-chefe da exploração predatória é a madeira tropical mais nobre e valiosa do mundo, o mogno. Batizada de ouro verde por seu alto valor comercial, ela é vendida a US\$ 1,4 mil por tora. Entre 1971 e 2001 foram extraídos 2,5 milhões de árvores. Dois terços seguiram para os EUA e a Inglaterra (MENCONI, 2003).

O atual governo prepara um banco de dados com o nome científico e popular das várias espécies nativas. Disponível na internet, ele poderia coibir, iniciativas como a da empresa japonesa Asahi Foods, que abocanhou as marcas cupuaçu e acerola. Não adianta nem reclamar direitos na Justiça porque a maracutaia esconde uma briga de gigantes. Os países ricos relutam em reconhecer o conhecimento tradicional de povos nativos como propriedade intelectual. Em compensação, defendem as patentes sobre genes e princípios ativos encontrados na natureza. Na prática, vale quem for mais rápido no gatilho em registrar marcas e patentes no Exterior (MENCONI, 2003).

Nossos recursos genéticos são subutilizados, em geral amarram a pesquisa nacional e abrem brechas para interesses menos legítimos. É impossível sobrevoar

a floresta e reconhecer do alto quais plantas têm efeito terapêutico. O único jeito de aprofundar o conhecimento científico é se aproximar das populações tradicionais, que quase nunca são remuneradas. A ministra do Meio Ambiente, Marina Silva, autora do primeiro projeto de lei de combate à biopirataria, há oito anos engavetado no Congresso, promete enviar um projeto de lei para substituir a atual medida provisória que rege o setor, no qual propõe penas para a biogrilagem. "A legislação é essencial, mas a conscientização da sociedade é fundamental para impedir esse crime duplo, que rouba nossas riquezas e impede nosso desenvolvimento", diz Marina (MENCONI, 2003).

Pela legislação atual, biopirataria não é crime. Por isso, os 29 americanos, holandeses, suíços e alemães presos nos últimos dez anos pela Polícia Federal somente no Amazonas foram enquadrados na lei que trata do transporte ilegal de animais e plantas e, logo depois, liberados sob pagamento de fiança. Sabendo da facilidade, os biopiratas estão mais ousados e sofisticados. A PF e o Ibama já apreenderam com falsos turistas mapas detalhados da Amazônia elaborados por satélites americanos, aparelhagem para medir a acidez da água e substâncias que adormecem animais embalados para "exportação" (MENCONI, 2003).

Para combater tanta sofisticação, a PF criou a divisão de repressão aos crimes ambientais, que coordenará o trabalho em delegacias especializadas. "Este é o setor mais sofisticado do crime organizado e para combatê-lo temos que conhecer o assunto", avisa o delegado e biólogo Jorge Pontes. A PF deu o nome do maior pirata da história - Drake - a uma operação em 11 Estados para tentar impedir o tráfico de animais e a saída de material genético pelas fronteiras. A dobradinha biopirataria e tráfico de animais é a terceira maior atividade ilícita do mundo, perdendo só para o tráfico de drogas e de armas (MENCONI, 2003).

Os índios também entraram na briga. Desde fevereiro, o Instituto Indígena Brasileiro da Propriedade Intelectual registra, os conhecimentos

tradicionais dos pajés. Integrado por advogados e sociólogos índios e pajés, o instituto vai tentar o reconhecimento internacional pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual. "Nosso saber deve ser respeitado para que as comunidades indígenas se beneficiem de tradições seculares", defende Marcos Terena, um dos criadores do instituto (MENCONI, 2003).

Campanhas de conscientização e a repressão policial são fundamentais; mas não suficientes. Até porque o biopirata conta com muitas saídas e com a fragilidade dos acordos internacionais ainda não regulamentados. A solução definitiva apontada pela Associação Brasileira de Empresas de Biotecnologia e a aprovação de uma legislação para regulamentar a bioprospecção, a pesquisa científica e o intercâmbio de material genético entre cientistas de outros países. "Os pesquisadores brasileiros ou estrangeiros terão que se submeter a contratos meticulosos para que o Brasil possa se beneficiar da sua biodiversidade", argumenta Antônio Paes de Carvalho, presidente da associação (MENCONI, 2003).

O interesse dos estrangeiros é tanto que há 20 anos uma indústria suíça controla a Pentapharm, um dos mais importantes serpentários do País, localizado em Uberlândia, Minas Gerais. Ali se criam em cativeiro as cobras jararacuços, uma espécie do grupo das jararacas. Toda a produção de veneno segue para a Suíça, que o transforma num medicamento anticoagulante. Para espanto dos desavisados, o negócio é legal e tem permissão de todos os órgãos governamentais para exportar o veneno das cobras tupiniquins (MENCONI, 2003).

Enquanto a solução não vem, Francisco José Abreu Matos, da Universidade Federal do Ceará, registrou 700 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades medicinais. Ele avaliou a toxicidade e a eficácia terapêutica de 70 espécies e reuniu os dados no livro *Farmácia viva*, com isso, garante Matos, é possível baratear o custo dos medicamentos. "Há uma grande dificuldade para as plantas brasileiras se tornarem fonte de renda e as pesquisas acabam entregando o ouro ao bandido", acrescenta (MENCONI, 2003).

1.4. Gênero *Copaífera* e o óleo de *Copaíba*

Os trabalhos realizados sobre o gênero *Copaífera* L. estão, em sua maioria, relacionados com o óleo que é exudado do tronco destas árvores, o óleo de copaíba, facilmente encontrado na região tropical da América Latina. Desde os primeiros anos de descobrimento do Brasil, o óleo de copaíba vem sendo indicado para diversos fins, farmacológicos ou não.

A nomenclatura botânica segue, como norma, os nomes mais antigos dados às plantas. Em alguns casos, entretanto, são feitas exceções frente à utilização corrente de outros nomes. Uma destas exceções está nas leguminosas, cujo nome mais antigo é *Faba*, mas *Fabaceae* Lindley dá lugar a *Leguminosae* Juss, na nomenclatura desta que é uma das mais importantes famílias botânicas. A classificação mais moderna da família *Leguminosae* a divide em três subfamílias: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (ou *Faboideae*) (JUDD, *et al.*, 1999). Por esta classificação, que segue o sistema de Engler, o gênero *Copaífera* L. pertence à família *Leguminosae* Juss., sub-família *Caesalpinoideae* Kunth. Segundo outro sistema de classificação, o de Cronquist, o gênero *Copaífera* L. Pertence à família *Caesalpiniaceae* R.Br. A classificação apenas como *Fabaceae* também é encontrada em alguns livros (HARBONE *et al.*, 1971; LEWIS & ELVIN-LEWIS, 1977).

Muitos botânicos e cronistas que estiveram nas Índias Ocidentais e na América no início da colonização descreveram espécies do gênero *Copaífera*. Em 1628, MarcGrave e Piso descreveram os aspectos morfológicos da planta, empregando o termo "Copaíba" sem designar espécies (PISO & MARCGRAVE, 1625). Mais tarde verificou-se, através dos caracteres descritos pelos dois cronistas, que a espécie estudada foi a *Copaífera martii* (DWYER, 1951). JACQUIN, 1760, descreveu em detalhes a primeira *Copaífera* como *Copaiva officinalis* Jacq. mas, como não possuía o fruto, baseou sua descrição nos aspectos do fruto da espécie estudada por MarcGrave e Piso. Somente dois anos

depois, o cientista sueco Carl von Linneu descreveu corretamente a *Copaifera officinalis* (LINNAEUS, 1762), assumindo a descrição oficial do gênero *Copaifera* L.

HAYNE, 1825, publicou uma monografia com oito novas espécies de *Copaifera* que, apesar de um pouco confusa em vista do conhecimento atual, constituiu o mais importante tratado de descrição do gênero e serviu como base para estudos como o de Bentham, na Flora Brasiliensis, realizado durante a expedição com o naturalista VON MARTIUS, 1870.

Os trabalhos mais recentes de descrição de novas espécies foram realizados por Harms e Ducke, este último com contribuições de extremo valor sobre as espécies da Região Amazônica (DUCKE, 1932; DUCKE, 1949) e do estado do Ceará (DUCKE, 1967), e por Dwyer, que realizou um levantamento das espécies americanas (DWYER, 1945; DWYER, 1954).

As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende da México ao norte da Argentina (VON MARTIUS, 1870; BURKART, 1943; DWYER, 1951; DWYER, 1954; ALENCAR, 1982).

Segundo a última edição do INDEX KEWENSIS, 1996, o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas só são encontradas no Brasil (DWYER, 1951).

Popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, as copaíbas são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador) (ANDRADE JR. *et al.*, 2000), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (PIO CORRÊA, 1931;

WOOD, *et al.*, 1940; MORS & RIZZINI, 1966; SOUZA & ABREU, 1977; PERROT, 1994).

No Brasil, a espécie *C. langsdorffii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída em quase todo o território nacional (da Amazônia a Santa Catarina, no Nordeste e Centro-oeste) e por possuir quatro diferentes variedades: *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (LEITE, 1993). A espécie usada nos nossos experimentos foi a *C. langsdorffii* Desf.



FIGURA 3 - Mostra o mapeamento das regiões onde espécies do gênero *Copaifera* foram encontradas.

As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjadas em panículos axilares (JACQUIN, 1760; PIO CORRÊA, 1931; SILVA, *et al.*, 1977; ALENCAR, 1982; VAN DEN BERG, 1982; BAILLON, 1886).

A floração e frutificação das copaíbas ocorrem a partir dos 5 anos de idade, em plantios. A floração ocorre entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro, com variações dentro destes intervalos, dependendo da região e clima, com ausência de florescimento anual, em algumas regiões (SANTOS, 1979; CARVALHO, 1994).

Nectíferas, algumas espécies, como a *Copaifera langsdorffii*, são polinizadas no período diurno, de 8:00 às 16:00 horas, com grande participação de *Trigona sp* e *Apis mellifera* (CRESTANA & KAGEYAMA, 1989), tendo sido encontrados grãos de pólen provenientes de *Copaifera* em amostras de mel do estado do Ceará (BARTH, 1971).

À época da frutificação, as copaíbas são visitadas no período diurno por aves, as quais são as maiores responsáveis pela dispersão de suas sementes, como o tucanuçu (*Ramphastos toco*), a galha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*) e o sabiá, que engolem o arilo e regurgitam a semente (CARVALHO, 1994). No período noturno, as copaíbas são ponto de encontro de diversos mamíferos, como os macacos mono-carvoeiros (*Cebus apella nigrinus*) (DI BIRETTI *et al.*, 2000), observados no Parque Nacional de Iguazu, na Argentina, e que utilizam sua copa como ponto de descanso noturno, como pequenos roedores que apreciam os frutos e são atraídos pelo cheiro de cumarina presente nas sementes maduras e, por último, os silvícolas, no norte do país, que apreciam a carne destes pequenos roedores e utilizam as copaíbas como local de espera de caça.

A biologia das sementes de *C. langsdorffii* foi estudada por diversos pesquisadores que abordaram desde sua morfologia e anatomia (CRESTANA & BELTRATI, 1988), passando pela sua conservação (EIRA, *et al.*, 1992) e maturação (BARBOSA, *et al.*, 1992), até germinação (BORGES & BORGES, 1979).

Sua identificação botânica é difícil, sendo realizada, na maioria das vezes, segundo características das flores, como: pubescência das sépalas,

comprimento dos anteros e a condição glabrosa ou não do pistilo (DWYER, 1951). As características dos frutos são igualmente importantes, mas estes são dificilmente encontrados em coleções botânicas.

A designação correta para o óleo de copaíba é a de óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (BRUNETON, 1987). Também é chamado, erroneamente, de bálsamo de copaíba (FIGUEIREDO, 1935; BRUNETON, 1993), apesar de não ser um bálsamo verdadeiro, por não conter derivados do ácido benzóico ou cinâmico (DWYER, 1951; PIO CORREA, 1931; ROBBERS *et al.*, 1996).

O óleo de copaíba é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Estes canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares (mcatos) que se intercomunicam no meristema, chamadas de canais esquizógenos (OLIVEIRA, 1905). O caráter mais saliente deste aparelho secretor está no tronco, onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com um traçado irregular, em camadas lenhosas, muitas vezes sem se comunicarem (OLIVEIRA, 1905; ALENCAR, 1982). Segundo alguns autores, o óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982).

São vários os métodos relatados para a retirada do óleo de copaíba. Antigamente, obtinha-se o óleo através de cortes a machado no tronco, o que inutilizava a árvore (LE CONTE, 1927). A incisão em V, colocando-se abaixo vasos apropriados para receber o óleo, à semelhança da extração de borracha (OLIVEIRA, 1905; MATTA, 1913), e o chamado método do arrocho, que consiste em selar o tronco, abaixo das incisões, com embiras e cipós e coletar o óleo da árvore até o seu esgotamento, provocando sua morte, são métodos há muito tempo abandonados (OLIVEIRA, 1905). A retirada por meio de bomba de sucção também é descrita (SILVA, 1923), porém pouco difundida.

A única prática de coleta não agressiva é aquela realizada através de uma incisão a cerca de 1 metro de altura do tronco (LE COINTE, 1927; ALENCAR, 1952). Terminada a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. A argila pode ser facilmente retirada, permitindo que se façam outras coletas no mesmo tronco (PERROT, 1943), obtendo-se quantidade de óleo igual ou mesmo superior a da primeira retirada (ALENCAR, 1952). Nesta primeira extração a quantidade de óleo obtido varia bastante. Alguns cronistas descreveram que uma única árvore pode gerar até 40 ou 50 litros de óleo por ano (PISO, 1625; MATTA, 1913; GRIEVE, 1994), apesar de nem todas as espécies serem capazes de produzir essa quantidade (PIO CORREA, 1931).

O interesse na madeira de determinadas espécies de *Copaifera* também é grande. Sua superfície é lisa, lustrosa, durável, de alta resistência a ataque de xilófagos e baixa permeabilidade, própria para fabricação de peças torneadas e de marcenaria em gera (CARVALHO, 1942)l. A árvore também é utilizada na fabricação de carvão (LOUREIRO, 1979) e pelas indústrias de construção civil e naval (SOUZA, 1977; CARVALHO, 1994).

O interesse pela madeira e a utilidade do óleo de copaíba fez com que o governo imperial regulasse a derrubada das copaibeiras através de um ato expedido em 1818, segundo o qual as árvores só poderiam ser derrubadas por conta do estado, vendidas com 20% de lucro para a produção de mastros e vergas de navio (CESAR, 1956).

Apesar deste ato, as árvores continuaram a ser derrubadas até os dias atuais; com a sua extração não racional. O interesse na madeira e os desmatamentos crescentes na Região Amazônica acabaram transformando o óleo de copaíba em subproduto da indústria madeireira. Sua fonte nos mercados municipais de Manaus e Belém, varia de acordo com a situação das estradas que levam os caminhões com madeira por toda parte. No estado de Rondônia, é comum encontrar mulheres e filhos de madeireiros ao longo da estrada que liga

Porto Velho a Ariquemes e Ji-Paraná, vendendo óleo de copaíba em baldes de plástico. Hoje em dia, a maior parte do óleo é obtida através do processo de extração total, com a derrubada da árvore (VEIGA JR & PINTO, 2002).

O óleo de copaíba é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Para utilização farmacológica, os óleos mais escuros e viscosos (DUCKE, 1939) são os preferidos (RODRIGUES, 1894; SILVA, 1911; MATTA, 1913; SILVA, 1923; PENNA, 1946; SILVA, 1951; RODRIGUES, 1989). Somente na espécie *C. langsdorffii*, o óleo de copaíba apresenta-se vermelho, semelhante ao sangue de dragão (*Croton sp.*), recebendo a denominação popular de copaíba vermelha (MEDEIROS *et al.*, 1985; MATTOS FILHO *et al.*, 1993).

Segundo LAWRENCE, 1980, as espécies botânicas mais freqüentemente utilizadas na produção de óleo são: *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) e *C. officinalis* (5%).

Dentro de determinada espécie produtora também ocorrem variações quali e quantitativas (VEIGA JR., 1997). Algumas árvores praticamente não exudam óleo ou o fazem em quantidades muito pequenas para coleta (o que os mateiros chamam de "árvores macho") (GÂNDAMO, 1576). A quantidade de resina pode ser influenciada (aumentada) por fatores como o aumento de luminosidade e a diminuição de nitrogênio no solo (LANGENHEIM, 1990). Nos estudos realizados com *C. multijuga*, com retiradas periódicas de óleo de copaíba, foram obtidas maiores quantidades de óleo na estação chuvosa em árvores localizadas em terreno argiloso (ALENCAR, 1982).

Um dos aspectos interessantes da copaíba é o procedimento da retirada do óleo utilizado pelos indígenas e ainda observado no interior do Brasil. Muitos destes procedimentos são considerados místicos pela ciência de hoje, embora tenham sido adquiridos pelos indígenas através da experimentação empírica durante milhares de anos. Vários cronistas, que estiveram na América Latina em regiões tão diferentes como a bacia amazônica e do Prata e o Nordeste brasileiro,

relatam a utilização das mesmas técnicas por índios separados por milhares de quilômetros (VEIGA JR & PINTO, 2002).

Segundo o Príncipe MAXIMILIANO, 1958, que esteve na região do Espírito Santo no início do século XIX, "...é crença geral que a incisão deva ser feita em lua cheia e o óleo colhido no quarto minguante...". João Ferreira Rosa, em seu Tratado Único da CONSTITUIÇÃO PESTILENCIAL, de 1694, relatava: "*Neste pau, nas noites de lua cheia, quando os frutos estão maduros, se faz golpe até a medula,..., correr óleo em grande quantidade*".

Ainda hoje os mesmos procedimentos são seguidos pelos silvícolas, alguns deles, com muito misticismo. Afirmam que quando o machado atinge o cerne, a árvore dá um longo suspiro e o óleo começa a correr (CESAR, 1956). Para a retirada do óleo, segundo estes, a árvore não deve ser olhada diretamente (para a copa), sob pena da árvore secar e o óleo voltar para a terra. A ascendência do óleo da terra é comumente relatada por mateiros do norte do país, embora não encontrada na literatura. Segundo alguns deles, sob a influência da lua cheia de agosto, o óleo sobe da terra para a árvore e esta é a época mais indicada para a retirada do óleo. Vários relatos confirmam este período de coleta (ROSA, 1694; LANGGAARD, 1872; GRIEVE, 1994).

1.5. Histórico e aplicações do Óleo de Copaíba

A origem do nome copaíba parece vir do tupi: cupayba, a árvore de depósito, ou que tem jazido, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior (O TUPI NA GEOGRAFIA NACIONAL, 1928). Chamado de copaíva (PECKOLT, 1942) ou copahu (LÉRY, 1578) pelos indígenas [do tupi: Kupa'iwa (LÉRY, 1578) e Kupa'ü (GRANDE ENCICLOPEDIA LARRROUSSE CULTURAL, 1998), respectivamente, e cupay, na Argentina e no Paraguai (guarani) (VON MARTIUS, 1854), o óleo de copaíba e suas propriedades medicinais eram bastante difundidos entre os índios latino-americanos à época que aqui chegaram os primeiros exploradores europeus no século XVI. Este conhecimento, tudo indica, veio da

observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras para cicatrizar suas feridas (CARDIM, 1998; SALVADOR, 1975), como observou o holandês Gaspar Barléu (BARLÉU, 1974; SALVADOR, 1975):

"...Vêem-se estas plantas esfoladas pelo atrito dos animais, que, procuram instintivamente este remédio da natureza..."

As propriedades do óleo tão apreciado pelos índios, que o usam principalmente como cicatrizante e antiinflamatório, fizeram com que a copaíba fosse uma das primeiras espécies a serem descritas pelos cronistas portugueses (MARC GRAVE, 1942; PISO, 1957; CARRARA & MEIRELLES, 1996).

A primeira citação sobre o óleo talvez tenha sido em uma carta de Petrus Martius ao Papa Leão X, publicada em Estrasburgo, em 1534, em que a droga utilizada pelos índios era chamada de "Copei" (DWYER, 1951).

Uma publicação da mesma época do padre Jesuíta José Acosta, "De Natura Novi Orbis", foi traduzida do latim para o francês em 1606. Na tradução portuguesa de José Maffeu, intitulada "História Natural e Moral das índias", encontra-se o seguinte texto (ACOSTA, 1792):

*"... o bálsamo é celebrado com razão por seu excelente odor e muito maior efeito para curar feridas, e outros diversos remédios para enfermidades, que nele se experimentam...
...nos tempos antigos os Índios apreciavam em muito o bálsamo, com ele os índios curavam suas feridas e que delas aprenderão os espanhóis..."*

O jesuíta José de Anchieta, em sua longa carta ao Padre Geral, datada de São Vicente, em fins de 1560, comenta as utilidades do óleo de copaíba (RODRIGUES, 1934):

"...exala um cheiro muito forte porém suavíssimo e é ótimo para curar feridas, de tal maneira que em pouco tempo nem mesmo sinal fica das cicatrizes."

A descoberta da terapêutica indígena permitiu que os primeiros médicos que trabalharam no Brasil contornassem parcialmente a escassez dos remédios empregados na Europa, cujo suprimento a Colônia era intermitente. As práticas indígenas eram tão difundidas, que os viajantes sempre se abasteciam destes medicamentos, "comprovadamente eficientes", antes de excursões por regiões pouco conhecidas (CARRARA & MEIRELLES, 1996).

As utilidades farmacológicas do óleo de copaíba também foram citadas em 1576, por Pero Magalhães Gandavo, um dos primeiros cronistas da História Brasileira (GANDAVO, 1576; VOGT & LEMOS, 1982).

As citações mais remotas da aceitação desta farmacopéia indígena na América pelos europeus datam de 1587, quando Gabriel Soares de Sousa (c.1540-c.1592), no seu "Tratado Descritivo do Brasil", registrou a utilização do óleo de copaíba e chamou os produtos medicinais utilizados pelos índios de "as árvores e ervas da virtude" (CARRARA & MEIRELLES, 1996).

Todos os mais importantes cronistas que estiveram no Brasil relataram as propriedades dos óleos de copaíba. Ainda no século XVI, Jean de LERY, em 1578, e os padres Fernão CARDIM, em 1584, Francisco SOARES, em 1594 e Simão TRAVAÇOS, em 1596, citam o óleo como um excelente cicatrizante (CUNHA, 1998).

No século XVII, vários outros viajantes relatam as propriedades deste óleo, como RODRIGUES, em 1607, SILVEIRA, em 1624, e MORÃO, em 1677, ano em que o óleo de copaíba foi inserido na farmacopéia britânica (LEITE, 1998).

São muitas as denominações que o óleo das copaibeiras recebe nas diversas regiões da América Latina onde é utilizado. Na Região Amazônica, o uso do óleo de copaíba é tão extenso, que a copaíba destaca-se como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população (MING, 1995). O óleo pode ser encontrado em mercados populares e é conhecido por diferentes denominações, como: Copahyba, Copaibarana (RODRIGUES, 1989), Copaúba, Copaibo, Copal, Maram, Marimari e Bálsamo dos Jesuítas (DUCKE, 1939).

Fora da Região Amazônica a espécie mais comum é a *Copaifera langsdorffii*, conhecida por diversos nomes nas várias regiões onde é encontrada, a saber: óleo-de-copaíba (RJ, SP, ES), óleo-pardo, óleo-vermelho (BA, RJ, SP), bálsamo, caobi, copaíba, capaúba (MS), coopaíba (MG), copaí, copaibeira, copaibeira-de-minas, capaúba (SP), copaíba-preta, copaíba-de-várzea, copaíba-vermelha, óleo-amarelo, óleo-capaíba (BA, MG), copaúva, cupaúva, cupiúva, cupiuba, oleiro, óleo (MG, PR), pau-óleo (PR), pau-óleo-de-copaíba, pau-óleo-do-sertão (BA), pau-d'óleo, podoi (PI, CE), e copaibeira nos demais estados do sul do país (BRAGA, 1960).

Na Venezuela, o óleo de copaíba é o aceite de palo, cabimba, cabima, aceite de zaraza ou bálsamo de copaiba e na França, o huile de copahu, baume de copahu ou huile rouge de copayer (FONSECA, 1927).

A confusão de nomes é bastante grande mesmo dentro de um só estado. A *Copaifera martii*, por exemplo, é conhecida no Pará como copaiba ou copaíba jutaí, em Óbidos, jutaí pororoca, em Montalegre e copaibarana, em Santarém (FONSECA, 1927). Jutaí e copaibarana também são nomes populares de outras duas leguminosas: *Hymenaea courbaril* e *Macrolobium microcalix* (SILVA *et al.*, 1977), respectivamente. Copaibuçu (ou, copaíba grande) é um nome atribuído a *Ficus gameleira* (Moraceae) (CUNHA, 1998), pela semelhança da copa das duas árvores quando encontradas em regiões abertas (HOENE, 1941).

Não só os nomes, mas também os óleos de copaibeiras são confundidos com óleos de árvores de outros gêneros da família Leguminosae. A confusão mais comum ocorre com os óleos do gênero *Eperua*. Apesar de mais resinosos e de coloração diferente, esverdeado, os óleos exudados das espécies *E. oleífera* e *F. purpurea* são conhecidos popularmente com nomes correlatos aos da copaíba, como copaíba-jacaré (MORS & RIZZINI, 1966) e copaibarana, respectivamente (DUCKE, 1932). O óleo da espécie *E. falcata* (GRENAND & MORETTI, 1987) também é utilizado na medicina popular de modo análogo ao da copaíba (FLEURY, 1997), como cicatrizante, antifúngico e bactericida (GRENAND & MORETTI, 1987).

As utilizações da medicina popular para o óleo de copaíba são muitas (PIO CORRÊA, 1931; FIGUEIREDO, 1935; FREISE, 1937; DEUSSEN, 1939; ROSSELLS, 1977; RODRIGUES & MACHADO, 1977; GUILLEN, 1977; ALENCAR, 1982) e indicam uma grande variedade de propriedades farmacológicas. As principais atividades relatadas foram de antiinflamatório das vias superiores e inferiores e cicatrizante. A **TABELA 2** apresenta algumas das utilizações populares dos óleos de copaíba.

Devido ao grande número de indicações medicinais, o óleo de copaíba já foi considerado a verdadeira panacéia (ROSA, 1964), mas a sua utilização e, principalmente, sua prescrição médica diminuiu muito nas últimas décadas. À época do seu descobrimento pela terapêutica ocidental, algumas de suas principais propriedades foram deixadas de lado em função de sua grande atividade contra alguns males para os quais não havia medicação eficiente, como a blenorragia e a gonorréia. No século XVIII, a experiência secular já então limitava as indicações e o produto fez-se quase um específico para as vias urinárias. Assim o empregaram F. Hoffmann (1660-1742), W. Cullen (1710-1790) e J. Hunter (1748-1793) e Trousseau (1801-1867) (ROSA, 1964).

A descoberta neste século de agentes terapêuticos sintéticos mais eficientes, como a penicilina (GOODMAN & GILMAN, 1945), diminuiu bastante sua utilização.

Para outras indicações, como as propriedades cicatrizantes, para o qual o óleo de copaíba foi muitas vezes descrito, é pequena a utilização nos dias de hoje. Nos últimos anos, entretanto, o retorno à terapêutica natural trouxe de volta os fitoterápicos para as farmácias de todo o país, mas o conhecimento de sua utilização e suas aplicações se perderam, ou aparecem bastante confusos nas centenas de publicações que não apresentam mais que duas ou três propriedades farmacológicas já bastante conhecidas.

Algumas das propriedades hoje esquecidas são descritas por pesquisadores que estudaram sua utilização junto aos silvícolas. Um exemplo é a descrição de BERTONI, em 1927, que passou vários anos estudando os costumes dos índios guaranis no Paraguai:

"É evidente a ação do óleo de copaíba C. langsdorffii, no tratamento do reumatismo! Utiliza-se nas desinterias, em casos mais graves, onde a ipeca não resolvia. Em especial nos casos mais graves, com retite gangrenosa (...) Era a essa resina que apelavam quando não queriam que as feridas deixassem nenhuma cicatriz."

Convivendo com os tapuias, ROSA, 1694, foi um dos cronistas que melhor descreveu as utilizações do óleo de copaíba e a forma como deveria ser aplicado. As aplicações a quente e em compressas em partes externas só são encontradas em relatos mais antigos e hoje abandonadas da terapêutica. Rosa cita ainda a utilização do óleo em massagens na cabeça para curar paralisias, dores de cabeça e convulsões.

O chá das cascas e sementes da *Copaifera* também é indicado para diversos males, especialmente na Venezuela e Colômbia, onde são utilizados como anti-hemorroidal e purgativo (FONSECA, 1939; BARROS, 1982; MATOS, 1997) e

na Amazônia Brasileira é indicado no tratamento de moléstias pulmonares e asma (CARVALHO, 1994).

Na África Ocidental (Camarões) encontra-se apenas uma utilização medicinal para um óleo de copaíba específico, *Copaifera religiosa*, indicado no tratamento da sífilis e blenorragia (MALLART-GUIMERA, 1969).

TABELA 2 - Indicações etnofarmacológicas dos óleos de copaíba encontradas na literatura:

PROPRIEDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
Vias Urinárias	
- Antiblenorrágico	BRUNETON, 1993; OLIVEIRA, 1905; CESAR, 1956; PECKOLT, 1942; BRAGA, 1960; FONSECA, 1927; DUCHESNE, 1836; FREISE, 1933; MATOS, 1997.
- Antiinflamatório	FERREIRA, 1980; VIEIRA, 1992.
- Antigonorréico	OLIVEIRA, 1905; SILVA, 1911; GOODMAN & GILMAN, 1945; FONSECA, 1939.
- Antisséptico	BRUNETON, 1987; OLIVEIRA, 1905; GOODMAN & GILMAN, 1945.
- Cistite	WOOD, <i>et al.</i> , 1940; BRUNETON, 1987; CESAR, 1956; BOMPARD, 1964; FREISE, 1933.
- Estimulante	WOOD, <i>et al.</i> , 1940; GRIEVE, 1994; PECKOLT, 1942; DUCHESNE, 1836.
- Incontinência urinária	RODRIGUES, 1894; CRUZ, 1965.
- Sífilis	LEWIS, 1977; RODRIGUES, 1894.
Vias Respiratórias	

- Antiasmático - Bronquite - Expectorante - Inflamações de garganta - Hemoptise - Pneumonia - Sinusite	BARROS, 1982. WOOD, <i>et al.</i>, 1940; BRUNETON, 1993; CESAR, 1956; RODRIGUES, 1894; CRUZ, 1965; FREISE, 1933; BARROS, 1982. OLIVEIRA, 1905. FERREIRA, 1980; VIEIRA, 1992; FIGUEIREDO, 1979. FERREIRA, 1980. RIBEIRO, 1971. FERREIRA, 1980.
Outros - Afrodisíaco - Antitetânico (principalmente em recém-nascidos) - Antitetânico (contra o bacilo do tétano e nas convulsões) - Anti-reumático - Antiherpético - Anticancerígeno - Antitumoral (tumores de próstata) - Leishmaniose - Leucorréia - Contra paralisia - Dores de cabeça - Picada de cobra	RIBEIRO, 1971. CESAR, 1956; FONSECA, 1927; FREISE, 1933; TEIXEIRA, 1923. SILVA, 1911; RODRIGUES, 1894; VIEIRA, 1992. BRAGA, 1960; BERTONI, 1927; MATOS, 1997; RIBEIRO, 1971. VIEIRA, 1992. RODRIGUES, 1989; FIGUEIREDO, 1979. HARTWELL, 1967. GRENAND & MORETTI, 1987. CESAR, 1956; CRUZ, 1965. RIBEIRO, 1971. RIBEIRO, 1971. ROSA, 1694; BARLEU, 1974.

Em artigo recente, Fleury reviu as utilizações medicinais do óleo de copaíba na região da Guiana Francesa, onde é utilizada contra psoríase, leishmaniose e como cicatrizante e antiinflamatório (FLEURY, 1997).

A disseminação da indústria de produtos naturais em todo o mundo e no Brasil, nos últimos anos, levou à comercialização extensiva do óleo de copaíba pelos laboratórios farmacêuticos. Das pequenas cidades do interior da Amazônia, os óleos de copaíba são transportados para as cidades de Manaus e Belém, de onde são exportados para a Europa e América do Norte ou enviados para a região sudeste para serem vendidos pelas farmácias que comercializam produtos naturais. Os óleos podem ser encontrados nas farmácias de todo o país em diversas apresentações. As mais comuns são em cápsulas ou envasados em pequenos frascos de 30 mL.

No norte do Brasil, o caboclo faz amplo uso do óleo de copaíba. Ele o utiliza como produto medicinal e também como combustível na iluminação pública. As grandes distâncias, que devem ser vencidas na selva para encontrar as copaíbas, em geral 0,2-0,3 árvores por hectare, fazem com que a mistura do óleo de copaíba com outros óleos se torne uma prática comum. Os mateiros muitas vezes armazenam na mesmo recipiente os óleos de todas as copaibeiras que encontram, sem se preocuparem se provêm de árvores da mesma espécie botânica. Também os misturam com bálsamo de gurjum e com óleos de espécies de *Calophyllum*, que possuem densidade e aroma semelhantes (FREISE, 1937).

Também é comum a adulteração do óleo de copaíba com produto de menor valor agregado, com o objetivo de diluir o óleo. Estas adulterações já eram descritas desde o começo do século tanto na Europa, onde o óleo, exportado, era misturado com óleo de madeira e colofane (PIO CORRÊA, 1931), como no Brasil, onde publicações alemãs ensinavam como e onde comprar óleos de boa qualidade em cidades da Amazônia (FREISE, 1937; GILDEHEISTER & HOFFMAN, 1935). Hoje em dia ainda é comum que intermediários na comercialização do óleo de copaíba o misturem com água, óleo diesel e banha animal (LEITE, 1997). Essas

adulterações devem ainda ser somadas àquelas praticadas pelos laboratórios farmacêuticos, que utilizam óleos vegetais comestíveis como a soja e o milho para a diluição. Só recentemente uma metodologia para detectar estas adulterações foi desenvolvida (VEIGA JR. *et al.*, 1997).

A exportação dos óleos de copaíba para a Europa foi registrada desde o final do século XVIII, ocupando o segundo lugar nas exportações brasileiras de drogas medicinais (SIMONSEN, 1944; ARRUDA, 1980). Naquela época era comum que comunidades indígenas inteiras, da grande área que se estende desde a Região Amazônica até os estados de Maranhão e Mato Grosso, se ocupassem da extração do óleo (CARRARA & MEIRELLES, 1996).

Os franceses foram os que mais se dedicaram ao estudo e exploração do óleo de copaíba no passado. No período que antecedeu a primeira grande guerra, Hamburgo, na Alemanha, era o principal centro de importação do óleo de copaíba do Brasil e o distribuía para a Europa (cerca de 50 ton./ano), sendo a França responsável pelo consumo de mais de 6 ton./ano (PERROT, 1458). No período de pós-guerra, entretanto, foi quando se alcançou o maior valor global de exportação do óleo, obtendo-se a máximo de 225 toneladas, no ano de 1918 (FONSECA, 1927).

Com os dados que dispomos, nos períodos de 1796 a 1807, de 1839 a 1870 (CARRARA & MEIRELLES, 1996), de 1901 a 1934 (FONSECA, 1927) e de 1962 a 1996 (COMÉRCIO EXTERIOR DO BRASIL, 1962-1996; GILBERT, 1995; ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1996), podemos observar que as grandes oscilações na quantidade de óleo exportadas continuam até os nossos dias, com o volume variando de 101 a 59 toneladas de óleo nos anos de 1994 e 1996, respectivamente. Essa oscilação e a pequena quantidade de óleo de copaíba consumida no mercado interno dificultam a organização de cooperativas extrativistas nos estados do norte do país e, conseqüentemente, a sobrevivência das comunidades que têm na exploração do óleo sua fonte de subsistência.

Outros períodos de grande volume de exportação foram nos anos de 1925 e 1953 (CARRARA & MEIRELLES, 1996).

Nas últimas três décadas, o destino das exportações brasileiras de óleo de copaíba esteve dividido entre a França, a Alemanha, a Inglaterra e os Estados Unidos, este último o principal importador, alcançando 20,8 toneladas no ano de 1973. Os últimos dados disponíveis datam de 1996. A partir de 1997, o óleo de copaíba, por apresentar pequeno volume no montante de produtos exportados, deixou de possuir estatística própria e passou a constar no volume de produtos minoritários dos anuários do IBGE. Segundo estes últimos dados, a Alemanha foi o país que mais importou o óleo de copaíba, superando os Estados Unidos e França (COMÉRCIO EXTERIOR DO BRASIL, 1962-1996).

Na indústria de perfumes, o óleo de copaíba é uma matéria-prima importante por ser um excelente fixador, com notas frescas e acres que combinam muito bem com as tradicionais notas florais (SIMONETTI, 1991).

O óleo de copaíba é utilizado também nas indústrias de cosméticos (FLEURY, 1997), por suas propriedades emolientes, como bactericida e antiinflamatório, na manufatura de sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus (DEL NUNZIO, 1985), cremes condicionadores (DEL CASTILHO, 1993), loções hidratantes (DEL CASTILHO, 1993) e capilares, para amaciar o cabelo (SOUZA & ABREU, 1977).

Na indústria de vernizes (SIMONETTI, 1991), o óleo de copaíba é utilizado na formulação como secativo (WAKAO, 1978), substituindo o óleo de linhaça. Na pintura com porcelana, o óleo atua como solvente para as tintas em pó mas como seca rapidamente (2 a 3 dias) deve ser utilizado em conjunto com outros óleos para que a pintura demore mais para secar (WAKAO, 1978). Já na pintura em tela, o óleo é utilizado como "amolecedor" de vernizes de pinturas antigas, procedimento que pode gerar diluição também da camada de tinta, prejudicando a pintura (CESAR, 1956; MASSCHELEIN-KLEINER, 1995). A utilização do óleo de

copaíba na indústria de fotografia, como acelerador, também é citada na literatura.

Os óleos de copaíba, por serem muito ricos em hidrocarbonetos isoprenóides, podem ser convertidos, na presença de zeólitas, em misturas de substâncias poliaromáticas (STASHENKO, *et al.*, 1995). Por ser uma fonte rica e renovável de hidrocarbonetos, o uso do óleo de copaíba como combustível ecologicamente limpo tem sido extensamente avaliado. Calvin (MAUGH, 1979; CALVIN, 1980; CALVIN, 1982; CALVIN, 1987) e SIERRA (1983) descreveram as potencialidades do óleo como combustível, utilizado diretamente em mistura com óleo diesel numa proporção de 9 litros de óleo diesel para 1 litro de copaíba. Há também indicações na literatura da utilização do óleo de copaíba como aditivo para butadieno na confecção de borracha sintética (TILLOTSON, 1945) e como inibidor de corrosão de aço em solução salina (FRANCESHINI, 2002). O óleo tem sido utilizado também como fonte de substrato quiral na síntese de biomarcadores de sedimentos e resíduos de petróleo (IMAMURA, 1992).

Devido à grande quantidade de aplicações, muitos estudos se detiveram na avaliação do potencial de produção dos óleos de copaíba. Alencar realizou estudos silviculturais de regeneração natural das árvores (ALENCAR, 1984), germinação (ALENCAR, 1981) e produção de óleos (ALENCAR, 1982). Em espécies de *C. multijuga*, observou que a espécie apresenta alta percentagem de germinação (87,5%) e que a produção de óleo-resina, a qual alcançou 7 litros por ano em uma das árvores, é ideal para a comercialização com fins medicinais. Para finalidades energéticas, entretanto, seria necessário o estabelecimento de plantações com sementes de árvores-mãe, ou seja, espécimes que apresentassem uma maior produção do óleo (ALENCAR, 1982). Estudos populacionais e de germinação também foram realizados em espécies de *C. langsdorffii* (OLIVEIRA, 1995), *C. publifora* (RAMIREZ & ARROYO, 1990).

A casca da copaíba também encontra aplicações na tintura caseira, de onde se retira um corante amarelo, mediante cocção, utilizado para colorir fios de algodão (MIRANDOLA & MIRANDOLA, 1991).

1.6. Compostos Detectados no Gênero *Copaifera*

Os estudos mais antigos acerca do óleo de copaíba datam do início do século XIX. Schweitzer, em 1829, foi o primeiro a descrever a solidificação do óleo de copaíba em uma substância que cristalizava após longo tempo em repouso. A esta substância deu o nome de ácido copaívico. Flückiger observou um depósito similar no óleo de *Copaifera officinalis*, em Trinidad (WOOD *et al.*, 1940). FEHLING, em 1841, obteve um depósito cristalino diferente de uma copaíba do Pará, a que ele deu o nome de ácido oxycopaívico, de fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_3$, STRAUSS (WOOD *et al.*, 1940), em 1865, isolou outro ácido cristalino, de fórmula $C_{22}H_{34}O_4$, a que ele chamou de ácido meta-copaívico, com fusão entre 205°C e 206°C. Já no século XX, Tschirch encontrou os dois ácidos acima descritos, misturados a outros, não cristalizados (WOOD *et al.*, 1940). Keto, seu colaborador, descobriu outros dois ácidos no óleo de copaíba do Pará, a que chamou de ácido paracopaívico, de fórmula $C_{20}H_{32}O_3$, de ponto de fusão entre 142°C e 145°C; e ácido homoparacopaívico, de fórmula $C_{18}H_{28}O_3$, fundindo entre 111°C e 112°C (WOOD *et al.*, 1940).

O único destes ácidos que encontra similar nos diterpenos isolados e identificados após o advento das técnicas espectroscópicas parece ser o ácido paracopaívico. Delle Monache (DELLE MONACHE, *et al.*, 1970), 70 anos depois de Keto, isolou o ácido ent-11-hidróxi-labda-8(17), 13-dieno-15-óico do óleo de *Copaifera multijuga*, endêmico na Região Amazônica, que possui a mesma fórmula molecular e a mesma faixa de ponto de fusão.

Após o trabalho realizado por TSCHIRCH & KETO, 1901, DEUSSEN em 1912, GILDEHEISTER, em 1931, FREISE, em 1437 e GOTTLIEB & IACHAM, em 1945, realizaram estudos de densidade, solubilidade, índices de acidez e

saponificação de óleos de copaíba de diferentes espécies, assim como da essência, separada por arraste a vapor.

A composição química dos óleos de copaíba encontra-se definida em vários trabalhos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como metodologias modernas de isolamento e identificação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BRAGA, 1995), cromatografia com fluido supercrítico com detector de infravermelho (SFC-FT-IR) (MORIN *et al.*, 1989) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (β -ciclodextrina permetilada) (TAKEOKA *et al.*, 1990). Constatou-se serem os óleos constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos (VEIGA JR., *et al.*, 1995).

A **FIGURA 4** ilustra um cromatograma típico de óleo de copaíba, obtido através de cromatografia gasosa de alta resolução, com coluna de baixa polaridade. Neste cromatograma, sesquiterpenos (eluídos entre 8 e 13 minutos) e diterpenos (eluídos entre 20 e 26 minutos) são observados nas duas regiões de eluição.

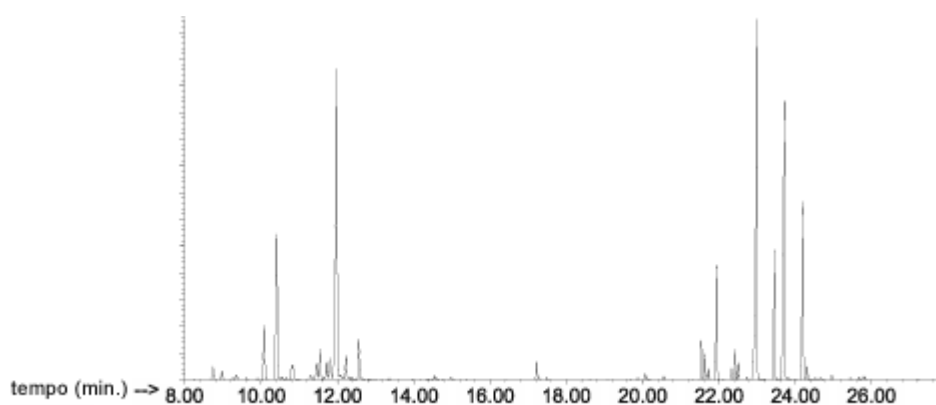


FIGURA 4 – Cromatograma típico de óleos de copaíba.

PINTO *et al.*, adaptaram a metodologia originalmente desenvolvida por MCCARTHY & DUTHIE, 1962, utilizando coluna cromatográfica de sílica impregnada com KOH para a separação de ácidos carboxílicos em biolipídios (que

foi depois modificada por RAMIJAK & ARPINO, 1977, para separação de ácidos de alcatrão). Esta adaptação foi utilizada na separação dos componentes do óleo de copaíba por classes de substâncias em: hidrocarbonetos, álcoois e ácidos carboxílicos, de acordo com o solvente utilizado para eluição da coluna (BRAGA *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos realizada com óleo de copaíba visou sua aplicação comercial na indústria de perfumes e cosméticos. A fração responsável pelo aroma do óleo de copaíba corresponde à dos sesquiterpenos. Estes compostos foram exaustivamente estudados e, hoje, o valor de concentrados de sesquiterpenos de *Copaifera* chega a ser 600 vezes maior do que o do óleo bruto. Os sesquiterpenos são geralmente identificados por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) através da comparação de seus índices de kóvats (VEIGA JR *et al.*, 1997). Óleos comerciais, obtidos de várias regiões do Brasil, foram analisados por CGAR, espectrometria de massas, mostrando uma grande quantidade de sesquiterpenos (mais de 40) e diterpenos, provavelmente fruto de misturas de óleos de diversas espécies do gênero (VEIGA JR *et al.*, 1997). Alguns estudos citam o óleo essencial, obtido através da destilação direta, à pressão reduzida ou por arraste de vapor do óleo-resina, como o verdadeiro óleo de copaíba. VEIGA JR & PINTO, 2002 estudaram os óleos obtidos por diversas técnicas de destilação dos óleos de *Copaifera multijuga* e analisaram a composição da resina e da fração sesquiterpênica, verificando degradações provenientes do processo de destilação.

Alguns compostos encontrados em óleos de copaíba apresentam aromas marcantes, sendo utilizados pela indústria de perfumes, como o α -humuleno (HARBONE & BAXTER, 1983), cariofileno (MERCK INDEX, 11^o ed.), α e β -selineno e β -bisaboleno (DUKE). Entre os sesquiterpenos que foram encontrados em óleos de copaíba, α -copaeno, β -cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno e δ e γ -cadineno foram descritos em grande parte dos óleos estudados.

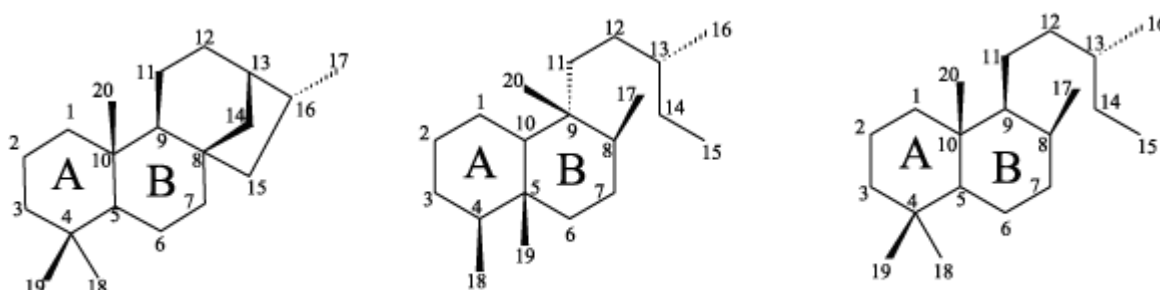
Alguns autores (LANGENHEIM, *et al.*, 1990) relacionam a variação na composição dos óleos em função de fatores bióticos externos, tais como a injúria

provocada por insetos ou fungos (LANGENHEIM, 1990). Um exemplo seria a produção de β -cariofileno, que é particularmente efetivo contra lepidópteros, e de seu óxido, que atua diretamente na inibição de fungos. As variações na composição sesquiterpênica dos óleos, porém, são muito grandes, descritas durante a maturação, ocorrendo sazonalmente em uma árvore, numa mesma espécie e entre espécies (LANGENHEIM, *et al.*, 1990). A presença de α -copaeno ou α -ilangeno nos óleos de copaíba, usualmente detectada através de cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), só pode ser confirmada utilizando-se a injeção realizada diretamente na coluna (On-Column), nas análises por CGAR, uma vez que os dois compostos sofrem isomerização durante a vaporização no injetor. A presença das duas séries de estereoisômeros entre sesquiterpenos de óleos de copaíba é relatada na literatura (TAKEOKA, *et al.*, 1990) para o α -copaeno, como 99% dextrógiro (+) e 1% levógiro (-). A presença majoritária do isômero (+) é importante, pois somente o (+)- α -copaeno é efetivo na atração da mosca de fruta do Mediterrâneo, uma praga que ataca frutas e flores na Europa (TAKEOKA, *et al.*, 1990).

Apesar da extensa literatura sobre óleos de copaíba, poucas referências discriminam a espécie de *Copaifera* que está sendo estudada. Somente 5 espécies têm sua composição química descrita na literatura. Muitos artigos não definem o local da coleta do óleo e outros citam locais onde a espécie não é endêmica. As espécies de *Copaifera* estudadas com identificação botânica, de acordo com sua localização, são: *C. multijuga* Hayne, abundante na região Amazônica, *C. langsdorffii* Desf., encontrada na região do cerrado, no nordeste, centro-oeste e sudeste brasileiro, *C. cearensis* Huber ex Ducke, nordeste brasileiro e *C. officinalis* L. e *C. reticulata* Ducke encontradas ao norte da Amazônia ocidental na região que se estende até a Venezuela (DWYER, 1951).

Os 28 diterpenos, descritos nos óleos de copaíba estudados, pertencem aos esqueletos caurano (ácidos cauranóico e caurenóico – **FIGURA 5**), labdano e clerodano. Em estudo realizado com diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos

analizados (VEIGA JR & PINTO, 1997). Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA JR & PINTO, 1997).



CAURANO

CLERODANO

LABDANO

FIGURA 5 – Numeração e estereoquímica normal dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B.

Estudos fitoquímicos foram também realizados com as sementes de *Copaifera salikounda* Heck, uma espécie do sul da África Ocidental (FICALHO, 1929), sendo detectadas cumarinas. Em estudos mais recentes realizados com o óleo das sementes de uma espécie de *Copaifera* brasileira foram encontrados cumarinas (0,15%) e os ácidos palmítico (24,9%), oléico (35,3%), linoléico (35,7%), araquidínico (1,1%) e beênico (3,0%) (CRAVEIRO *et al.*, 1978). Estudos realizados com óleos de sementes de *C. langsdorffii* mostraram a presença da cumarina umbeliferona (CRAVEIRO *et al.*, 1978) e de oligossacarídeos xiloglucânicos (MORS & MONTEIRO, 1959; BUCKERIDGE, *et al.*, 1992) com rendimento de 40% do peso seco da semente e alto peso molecular (2.000.000) (FRANCO *et al.*, 1996).

Aminoácidos não protéicos, como o N-metil-*trans*-4-hidroxi-L prolina, foram encontrados como cerca de 2-3% do peso seco das folhas das espécies *C. langsdorffii*, *C. multijuga*, *C. pubiflora*, *C. venezuelana* e *C. officinalis* (LANGENHEIM, *et al.*, 1987).

1.7. Atividades Farmacológicas do Gênero *Copaifera*

O Food and Drug Administration (FDA), órgão de regulamentação de drogas e alimentos do governo americano, aprovou o óleo de copaíba em 1972 (FCC, 1972). Testes de irritação e sensibilização do óleo de copaíba foram realizados com 25 voluntários, não se observando estes tipos de reação (KLIGMAN, 1966).

Entre as propriedades medicinais dos óleos de copaíba, a mais estudada foi a antiinflamatória. ZANINI *et al.*, 1988, estudaram a atividade antiinflamatória do óleo em ratos utilizando diversos modelos, como inibição de edema induzido por carragenina, inibição de formação de granuloma "Cotton-pellet" e aumento de permeabilidade vascular. Seus resultados indicam que o óleo possui atividade antiinflamatória e baixa toxidez (DL₅₀ 3.79 mL/kg). Apesar dos efeitos adversos por altas doses do óleo (irritação gastro-intestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central), seu uso é plenamente justificado na medicina popular. O estudo feito por ZANINI *et al.*, 1988, foi realizado com óleo comercial, sem identificação botânica da espécie que o produziu.

FERNANDES, *et al.*, 1992, estudaram o efeito analgésico e antiinflamatório dos óleos de *Copaifera cearensis*, comparado-os com os da indometacina e com o de alguns derivados isolados de óleos de copaíba como o ácido copálico, o éster metílico do ácido solidago e bisabolol. Os resultados do estudo indicam que o óleo possui atividades antiinflamatória e analgésica maiores que aquela dos três compostos estudados isoladamente, porém menores que da indometacina (FERNANDES, *et al.*, 1992).

Estudos recentes realizados com diversos óleos de copaíba comerciais (VEIGA JR., *et al.*, 2001) de *Copaifera multijuga* mostram que a fração que contém hidrocarbonetos tem maior atividade antiinflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos.

Óleos de copaíba comerciais mostraram atividades de proteção contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* (GILBERT, *et al.*, 1972), e como cercaricida (MAHAJAN & FERREIRA, 1971; MAHAJAN, *et al.*, 1972), piscicida (MAHAJAN, *et al.*, 1972) e repelente de insetos (LACEY, *et al.*, 1981; JONES, *et al.*, 1983). Atividades antimicrobiana e antibacteriana também são relatadas na literatura (MARUSSELLA & SICURELLA, 1960; ABDULLIM, 1962; OPDYKE, 1976; LIMA, *et al.*, 1995; CASCON, *et al.*, 2000; MIRANDA, *et al.*, 2000).

Estudos de absorção na pele de camundongos, entretanto, mostraram que a absorção percutânea do óleo de copaíba é muito lenta, por volta de noventa e dois minutos (MEYER, 1959).

A atividade anti-tumoral de óleos de *Copaifera langsdorffii* foi observada contra carcinoma IMC, em camundongos (OHSAKI, *et al.*, 1994). O fracionamento guiado por bioensaio mostrou que os diterpenos colavenol e o ácido hardwíckico apresentam potente atividade anti-tumoral, sem, contudo, apresentarem citotoxicidade contra as mesmas células (OHSAKI, *et al.*, 1994). Para os óleos de *C. multijuga* a atividade anti-tumoral vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*, sendo observada esta atividade também para o óleo desta espécie. Nestes estudos, o óleo de *C. multijuga* tem inibido o crescimento tumoral (melanoma murino B16F10) através da redução da formação de nódulos de metástase no tecido pulmonar. Experimentos de viabilidade celular, realizados *in vitro* com este mesmo óleo, mostram uma significativa redução no número de células de melanoma viáveis. O óleo de *Copaifera multijuga* mostrou-se também tóxico e com potente atividade antitumoral tempo e dose dependente em ensaios contra células de mastocitoma murino P815 (LIMA, *et al.*, 2000).

A atividade gastroprotetora do óleo de *Copaifera langsdorffii* foi avaliada em lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Ratos pré-tratados com o óleo desta copaíba foram protegidos em doses a partir de 400mg/kg. Os resultados obtidos sugerem que a ação deste óleo se deve a diminuição de acidez gástrica, provavelmente através da promoção da secreção de muco gástrico e

bicarbonato, como foi demonstrado em pesquisa no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (PAIVA, *et al.*, 1998).

As propriedades cicatrizantes de feridas e úlceras, uma das principais indicações dos óleos de copaíba, foram estudadas em óleos comerciais por BRITO, *et al.*, 1998, 1999, e nos óleos de *Copaifera langsdorffii*, por PAIVA *et al.*, 2002.

Nos estudos de Brito, realizados em modelo de ferida aberta, os ratos que receberam óleo de copaíba na região dorsal apresentaram aumento de tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, porém, diminuição da quantidade de fibras colágenas (BRITO, *et al.*, 1998, 1999).

Nos experimentos realizados por PAIVA *et al.*, 2002, o óleo mostrou-se bastante ativo nos ratos em modelos de ferida aberta, resistência à tensão e úlcera crônica de estômago, produzida por ácido acético.

Uma das áreas em que se vem pesquisando intensamente a utilização do óleo de copaíba atualmente é a odontológica (PINHEIRO, 1993; BOMBONATTI & SCARANELO, 1996; COSTA, *et al.*, 1996). BANDEIRA, 1998, estudou a composição do óleo essencial, separado da resina do óleo de *Copaifera multijuga* e sua compatibilidade biológica em molares de rato, associados ao hidróxido de cálcio como veículo e as atividades bactericida e bacteriostática das duas frações frente ao óleo bruto. Os resultados de biocompatibilidade, obtidos com hidróxido de cálcio misturado ao óleo essencial do óleo de *Copaifera multijuga*, mostraram um melhor desempenho histopatológico que aquele com o hidróxido de cálcio misturado ao óleo de copaíba e ao polietilenoglicol, utilizado tradicionalmente. Os estudos de atividade antibacteriana mostraram maiores atividades bactericida e bacteriostática do óleo de *Copaifera multijuga*, frente a *Streptococcus mutans*, enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida e a resina apresentou-se apenas bacteriostática.

Propriedades anti-oxidantes são descritas para o extrato metanólico das cascas de *C. reticulata*. Testado quanto à redução de radicais livres, indicadores de dano ao DNA, o extrato metanólico mostrou-se bastante ativo, apresentando CI_{50} 3 μ g/ml, menor que a padrão utilizada, catequina (CI_{50} 5 μ g/ml) (DESMARCHELIER, *et al.*, 1997). O potencial anti-oxidante reativo total deste extrato também foi analisado quanto à redução de radicais livres em ensaios de quimioluminescência, mostrando uma atividade de 7500 μ M, em valores relativos ao padrão, Trolox (DESMARCHELIER, *et al.*, 1997).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com a *Copaifera multijuga* Hayne e suas frações mostraram uma atividade anticancerígena (LIMA *et al.*, 2003).

Vários dos compostos já isolados ou detectados nos óleos de copaíba já tiveram propriedades farmacológicas, descritas na literatura. Entre os sesquiterpenos, algumas propriedades como antiúlcera (YAMAHARA, 1992), antiviral (DENYER, *et al.*, 1992) e antirinovírus (DENYER, *et al.*, 1992) são descritas para o α -curcumeno e o β -bisaboleno, este último também descrito como abortivo (PEI-GEN & NAI-GONG, 1991). O bisabolol é conhecido por conferir propriedades antiinflamatória e analgésica à camomila (*Matricaria chamomilla*) (ZCKOVIC, *et al.*, 1994), o β -elemeno é descrito como anticâncer (cervico) (LEEWENBERG, 1987) e cariofileno e δ -cadineno como anti-cariogênico, sendo este último também bactericida (CMI 800 μ g/ml) (KUBO & MUROI, 1993).

Entre estes, entretanto, os que foram mais estudados e se mostraram ativos num maior número de ensaios foram o cariofileno e seu óxido. O cariofileno é descrito na literatura como: anti-edêmico (SHIMIZU *et al.*, 1990), fagorrepelente (KEELER & TU, 1991), antiinflamatório ($CI=100\mu$ M) (SHIMIZU *et al.*, 1990), antitumoral (ZHENG *et al.*, 1992), bactericida (KANG *et al.*, 1992), insetífugo (JACOBSON, 1990) e antialérgico (TANAKA *et al.*, 1996). Algumas destas atividades são também conferidas ao óxido (SHIMIZU *et al.*, 1990; KEELER & TU, 1991; ZHENG *et al.*, 1992), além de inseticida (BERTTARINI & BORGONOV, 1991).

O ácido kaurenóico é descrito na literatura como tripanossomicida (ALVES, *et al.*, 1995), atividade conferida também a óleos de copaíba que não contêm este diterpeno (YAMAHARA, 1992). Estudos realizados com ácido kaurenóico isolado de *Copaifera langsdorffii* mostram também atividade relaxante do músculo liso, sobre contrações uterinas induzidas (ALENCAR CUNHA, *et al.*, 2003).

O ácido kaurenóico e seus derivados foram capazes de inibir a atividade da Na-K-ATPase (NATTAYA, 2003). Um grande número de diterpenos tem mostrado capacidade de modular o processo inflamatório inibindo a atividade do fator nuclear kappaB (NF-kappaB) (CASTRILLO *et al.*, 2001).

Apesar da extensa literatura que trata dos óleos de copaíba, poucos são os artigos onde é encontrada a identificação botânica da espécie estudada. Os estudos de atividade biológica confirmam a sabedoria popular e o conhecimento adquirido dos índios pelos portugueses já no início da colonização. Poucos deles, porém, conseguem identificar os princípios ativos apesar de sugerirem que compostos fortemente ativos estão presentes.

Tudo isso indica que apesar de toda a pesquisa já realizada, os óleos de copaíba são potencialmente importantes como fonte de princípios ativos em farmacologia, portanto, resolvemos utilizar o óleo de copaíba bruto e o seu constituinte isolado, o ácido kaurenóico, nos modelos de colite ulcerativa e isquemia-reperfusão e cicatrização, na busca de substâncias capazes de interferir nas injúrias causadas por estes importantes modelos experimentais.

1.8. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

As doenças inflamatórias intestinais (DII), termo que compreende, principalmente, doença de Crohn e colite ulcerativa, são um problema de saúde pública em muitos países. A incidência de DII varia dentro de regiões diferentes. Por exemplo: na Ásia e na América do Sul as taxas de incidência da colite

ulcerativa e da doença de Crohn são de 0,5 e 0,08 por 100.000 habitantes, respectivamente. Já nos EUA a incidência é de 11 por 100.000 habitantes para colite ulcerativa e 7 para 100.000 habitantes para doença de Crohn (DAMIÃO & HABR-GAMA, 1993).

A idade de início da doença está entre os 15 e os 30 anos, tendo um segundo pico entre os 60 e os 80 anos. Não há predominância de sexo, mas uma possível associação com certas síndromes genéticas. Suas etiologias permanecem mal definidas (STEIDLER *et al.*, 2000).

Sugere-se que as DII decorram de anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microflora normal não patogênica, porém a patogênese permanece desconhecida (MATSUMOTO, *et al.*, 2001).

As DII caracterizam-se por inflamação intestinal crônica não infecciosa e manifestam-se clinicamente por diarreia, dor abdominal, perda ponderal e náuseas. A mortalidade é baixa e geralmente acontece nos primeiros anos da doença. Isto ocorre quando há alterações nutricionais, podendo causar desidratação e anemia, que aumentam a morbidade gerada pelas crises de diarreia (STEIDLER *et al.*, 2000). Nas doenças de longa duração a mortalidade está associada ao risco de câncer de cólon.

1.8.1. DOENÇA DE CROHN

A *Doença de Crohn* caracteriza-se por um envolvimento transmural e descontínuo dos intestinos, podendo atingir todo o tubo digestivo. Sua incidência nas últimas décadas vem aumentando. É mais comum na raça branca, iniciando-se mais freqüentemente entre os 20 e os 30 anos. Tem um componente genético hereditário importante e prevalência maior em indivíduos HLA-2 +, bem como nos HLA-B27+ quando associada à espondilite anquilosante. A etiologia é desconhecida, conquanto se estudem, além das causas imunes, possíveis causas

infecciosas. Observa-se, com freqüência, piora ou início da doença de Crohn associada a crises emocionais. A apresentação clínica da doença varia de acordo com a extensão, a intensidade e as complicações presentes. Acomete, com maior freqüência, o íleo terminal e o cólon, iniciando-se tipicamente com crises de diarreia, febre, dor abdominal e emagrecimento. Na evolução, podem surgir complicações locais, nutricionais e sistêmicas. A doença se agrava e as crises tornam-se mais freqüentes, gerando comprometimento do estado geral e piora da qualidade de vida do indivíduo (MAGALHÃES, 1993).

1.8.2. COLITE ULCERATIVA

A *colite ulcerativa* consiste em uma inflamação idiopática que envolve a mucosa do cólon e do reto, resultando em friabilidade difusa e erosões com sangramento. Pode, em 40 a 50% dos pacientes, ser limitada ao reto ou ao retossigmóide. Em 30 a 40% dos doentes vai além do sigmóide, não atingindo o cólon em toda a sua extensão e numa minoria, não mais do que 20%, atinge todo o cólon. Os principais sintomas são: diarreia, enterorragia, tenesmo, eliminação de muco e dor abdominal tipo cólica. A doença é caracterizada por períodos de recidiva sintomática e remissões e os sintomas, em geral, permanecem por semanas e até meses. Além disso, há intensa correlação da gravidade com a extensão da doença. Existem manifestações extra-intestinais em aproximadamente 25% dos doentes, incluindo o eritema nodoso, a epiesclerite e a artrite não deformante oligoarticular, entre outras (MAGALHÃES, 1993; PEAKMAN & VERGANI, 1999).

Nos últimos anos, uma das doenças mais estudadas tem sido a colite ulcerativa. Tal interesse deriva de suas variadas formas de apresentação, do crescente número de diagnósticos nos últimos anos, da importante morbimortalidade e de seu elevado custo social (HOULI & NETTO, 1984; TEIXEIRA, *et al.*, 1988; HAY & HAY, 1992; HODGSON, 1994). O marcado aumento no risco de câncer colorretal, chegando em alguns estudos a uma incidência cumulativa em 35 anos de até 25 % em pacientes com pancolite (BROSTRÖM *et*

al., 1987; EKBOM *et al.*, 1990; LENNARD-JONES *et al.*, 1990; PINCZOWSKI *et al.*, 1994) e o grau de incapacidade que a doença pode trazer (FERGUSON *et al.*, 1994) reforçam a relevância do assunto e a necessidade crescente da investigação nesta área.

O tratamento da colite ulcerativa encontra-se restrito pela sua patogênese obscura e pelo limitado entendimento dos eventos imunoinflamatórios que a desencadeiam. Até o momento, a intervenção terapêutica concentra-se, principalmente, no combate às conseqüências da amplificação das cascatas imunológicas e inflamatórias e às repercussões sistêmicas destas. O entendimento, ainda que incompleto, destes mecanismos tem proporcionado o desenvolvimento de linhas de pesquisa. Desta maneira, além dos tratamentos já consagrados avalia-se a utilização de imunomoduladores, inativadores de radicais livres, inibidores da síntese de leucotrienos e de inibidores do recrutamento de neutrófilos entre outros (BRYNSKOV, 1993; BERSTEIN & SHANAHAN, 1994; VAN HOGEZAND, 1994).

Modelos mais elaborados de pesquisa apresentam inúmeras dificuldades seja na operacionalização, possibilidade de vieses, dificuldade de extensão de suas conclusões ou pelo custo e tempo de realização. Neste contexto, os modelos experimentais de indução de colite, guardadas as suas limitações, podem servir como alternativas viáveis para estudar sua etiopatogenia ou mesmo seu manejo terapêutico (FUCHS & WANNMACHER, 1998). Existem vários modelos de indução da colite (ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfônico, carragenam/sulfato dextram, imunocomplexos, indometacina, tamarin, HLA-B27) (MACPHERSON & PFEIFFER, 1978; MORRIS *et al.*, 1989; FEDORAK *et al.*, 1990; FABIA *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1992; STENSON, 1994; WARREN & WATKINS, 1994; TANNAHILL *et al.*, 1995; ZAHAVI *et al.*, 1995).

As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais, doença de Crohn e colite ulcerativa promovem remissão das crises, mas não a cura da doença. Entre as mais conhecidas estão

sulfasalazina, o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), os corticosteróides e os agentes imunossupressores e imunorreguladores (azatioprina, mercaptopurina, methotrexate e ciclosporina). Muitos estudos estão sendo realizados em busca de novos tratamentos, entre eles: citocinas e anticitocinas (IL-1, IL-2, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18), interferon—alfa e gama (IFN- α e IFN- γ), supressores do TNF- α (talidomida, extrato polifenol de chá verde), vitamina D, antioxidantes, antibióticos, nicotina e óleo de peixe (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003)

1.8.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E AS DIIS

A DII é caracterizada pelo desenvolvimento de uma inflamação intestinal resultante da liberação local de mediadores inflamatórios (citocinas, eicosanóides) e de espécies reativas de oxigênio que levam ao aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias e finalmente dando origem a ulceração da mucosa (GRISHAM, 1994; STENSON, 1990).

O intestino delgado e cólon contêm uma grande variedade de enzimas capazes de gerar significativas quantidades de espécies reativas de oxigênio, incluindo a xantina oxidase, aldeído oxidase, prostaglandina sintase, lipoxigenase e uma variedade de amino oxidases como a monoamino oxidase e diamino oxidase. A fonte mais significativa destes radicais no intestino, com inflamação crônica, são os leucócitos fagocitários (ex. neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) – é bem conhecido que episódios ativos de DII idiopática são caracterizados pelo extravasamento e infiltração de um grande número de leucócitos no interstício. Este aumento do infiltrado inflamatório é acompanhado pela injúria da mucosa incluindo aumento da permeabilidade vascular, rompimento da matrix extracelular, edema, dano às células epiteliais e ulceração. Desde que a função primária das células fagocitárias é destruir microorganismos invasores, estas células possuem a habilidade de sintetizar e liberar grandes quantidades de radicais livres oxigenados. Embora não seja claro se estas células iniciam ou exacerbam a injúria intestinal, há boa evidência para sugerir que a inibição farmacológica ou imunológica de suas funções fagocitárias e de liberação

de mediadores atenuam a injúria e a disfunção associada à DII experimental ou humana (WALLACE, *et al.*, 1989; LAUREN, *et al.*, 1990; HARRIS, *et al.*, 1992).

Estudos utilizando detecção por quimioluminescência mostram elevada concentração de radicais livres oxigenados produzidos pelo cólon de animais com colite experimental e em pacientes com inflamação intestinal ativa (KESHAVARZIAN, *et al.*, 1992a; SIMMONDS, *et al.*, 1992). OSHITANI, *et al.*, (1993) utilizando localização histoquímica demonstraram que células endoteliais vasculares e monócitos de pacientes, com colite ulcerativa, produzem altas concentrações de ânion superóxido.

Em adição, os níveis de alguns antioxidantes estão diminuídos no cólon humano (GRISHAM, *et al.*, 1990; MULDER, *et al.*, 1991) e a maior parte da atividade enzimática da mucosa está associada com as células epiteliais do cólon, cujo interstício é essencialmente isento de significativa defesa enzimática contra estes radicais livres. Os radicais e oxidantes produzidos pelos leucócitos fagocitários, no intestino com inflamação crônica, podem facilmente abater o tecido, resultando em modificações oxidativas de vários alvos biológicos.

AHNFELT-RONNE *et al.*, (1990) encontraram que biópsias de cólon, de pacientes com DII ativa, apresentam níveis elevados de produtos da peroxidação lipídica. BUFFINGTON & DOE (1995) demonstraram que as defesas antioxidantes da mucosa estavam depletadas em amostras de biópsia de intestino inflamado de pacientes com DII, sugerindo que tal deficiência pode comprometer severamente a mucosa inflamada aos efeitos deletérios dos radicais livres oxigenados.

Várias linhas de evidências demonstram o efeito benéfico da suplementação antioxidante no intestino inflamado. Em modelos animais de colite, alguns benefícios terapêuticos foram observados com superóxido dismutase, catalase e α -tocoferol (KESHAVARZIAN *et al.*, 1990; KESHAVARZIAN *et al.*, 1992b; BLUMENSTEIN *et al.*, 1994).

Em adição, o intestino inflamado cronicamente é conhecido por produzir altos níveis de óxido nítrico (MIDDLETON, *et al.*, 1993). Embora as fontes desta geração de óxido não tenham sido claramente identificadas, existem crescentes evidências sugerindo que leucócitos fagocitários, assim como células epiteliais intestinais, possam ser dois fortes candidatos. As citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral, Interferon- γ e interleucina-1 β estão elevadas no intestino e/ou cólon com inflamação crônica (SARTOR, 1994). Reunido ao fato que essas citocinas sejam indutoras da NO sintase em macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (MONCADA & HIGGS, 1993) não é difícil de imaginar um cenário onde a inflamação induz a produção de óxido nítrico. Estudos mostram que a administração de certos inibidores da NO sintase atenuam a injúria tecidual e a inflamação em diferentes modelos de DII, sugerindo que o óxido nítrico possa exercer um papel direto ou indireto na promoção da inflamação e disfunção intestinal, sendo possível que a inibição do óxido nítrico possa proteger o intestino pela promoção da vasoconstrição, desse modo limitando a chegada de células e mediadores inflamatórios para o tecido (DAVID *et al.*, 1997).

Uma variedade de mecanismos antioxidantes está envolvido para combater um potencial ameaçador dos radicais livres sobre as estruturas biológicas vitais ao organismo (HALLIWELL, 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; STOCKER & FREI, 1991).

Frente à produção fisiológica, mas potencialmente perigosa, de radicais livres oxigenados, o organismo dispõe de defesas enzimáticas específicas. Estas enzimas, presentes no local de produção dos radicais livres, mantêm os mesmos em concentrações muito baixas (SIMON *et al.*, 1997).

A Catalase (HALLIWELL, 1988) está localizada no interior dos peroxissomas (organelas celulares que desempenham um papel importante na desintoxicação de diversos produtos), sua função é de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e em oxigênio molecular.

A Glutathione Peroxidase é uma enzima citosólica e intramitocondrial sendo o mecanismo para remoção do peróxido de hidrogênio mais importante que a catalase. A glutathione peroxidase, a única enzima humana conhecida que contém selênio em seu grupo prostético (selenometionina, um componente do centro ativo), catalisa a reação de peróxido de hidrogênio e glutathione reduzido, formando água e glutathione oxidado (GRIEB, 1992). Este sistema limita igualmente a propagação de radicais livres, ao reduzir os hidroperóxidos (ROOH) instáveis em ácidos graxos hidroxilados (ROH).

A cooperação de vários elementos dos sistemas antioxidantes e sua importância em proteger o organismo contra oxidações patogênicas ainda estão longe de serem elucidadas. O homem continua a pesquisa para elucidação deste sistema na busca de um composto antioxidante que apresente além de uma esperada atividade catalítica, a habilidade de penetração nas células, baixa toxicidade e baixo custo.

1.8.4. ANTIOXIDANTES DERIVADOS DE PLANTAS

Uma grande variedade de plantas medicinais e de seus princípios ativos apresentam atividade antioxidante.

O alho (*Allium sativum*) atenua o dano cerebral induzido pela isquemia cerebral em ratos (NUMAGAMI *et al.*, 1996), protege contra a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (WANG *et al.*, 1996), assim como seu princípio ativo "allicin", que previne a peroxidação lipídica de homogenato hepático *in vitro* (PRASAD *et al.*, 1995).

O ginseng (*Panax ginseng*) planta medicinal chinesa utilizada tradicionalmente para aumentar a resistência física e combater o estresse e a fadiga também apresenta atividade antioxidante (GILLIS, 1997), sendo capaz de sequestrar radicais hidroxila e prevenir a peroxidação lipídica (ZHANG *et al.*, 1996).

No México, assim como nos países da América Central o consumo de pimenta (*Capsicum annum*) é tradicional a centena de anos e esta é importante fonte de beta-caroteno e vitamina A, os quais possuem propriedade antioxidante (GONZAEZ DE MEJIA *et al.*, 1998).

O "Silymarin", uma mistura de flavonolignanas da planta medicinal *Silybum marianum*, é utilizada no tratamento de suporte de doenças hepáticas devido ao seu efeito hepatoprotetor, que é considerado envolver efeito antioxidante e estabilizador de membrana (SKOTTOVA & KREIMAN, 1998), além de promover gastroproteção no modelo de injúria gástrica induzida por isquemia-reperfusão (ALARCÓN DE LA LASTRA *et al.*, 1995).

O guaraná (*Paullinia cupana*) apresenta atividade antioxidante em inibir a peroxidação lipídica (MATTEI *et al.*, 1998).

O extrato de *Polygonum multiflorum* e uma fração contendo antraquinonas produzem proteção dose dependente contra a injúria miocárdia induzida pela isquemia-reperfusão em ratos (YIM *et al.*, 1998).

"Rubiadin", uma dihidroxiantraquinona isolada do extrato alcoólico de *Rubia cardifolia* possui potente propriedade antioxidante. Previne a peroxidação lipídica e sua propriedade antioxidante é melhor que a do EDTA, Tris, manitol e vitamina E (TRIPATHI *et al.*, 1997).

O EGb761 (Tebonin[®], Byk Química e Farmacêutica) é um extrato pradonizado das folhas de *Gingko biloba* sendo um potente antagonista da produção de radicais livres e da peroxidação das membranas celulares. O suporte bioquímico destas atividades pode ser os glicosídeos gikgoflavonas e as proantocianidinas. A proteção das membranas celulares explica claramente os efeitos obtidos sobre o vasoespasma arterial e sobre a reatividade metabólica dos

tecidos isquêmicos (GARDÉS-ALBERT *et al.*, 1990; GUILLON *et al.*, 1986; PINCEMAIL & DEBY, 1986).

1.9. Isquemia

Durante o episódio da isquemia, ou seja, quando existe oferta insuficiente de oxigênio, o rendimento da cadeia respiratória mitocondrial é baixo. Em anaerobiose, duas moléculas de ATP são produzidas a partir de uma molécula de glicose, contra 36 em aerobiose. A hipóxia persistente induz uma crise energética na bomba Na-K-ATPase da membrana, com entrada de sódio e cálcio na célula, o que aumenta a pressão osmótica e o edema intracelular. O cálcio intracelular ativa a fosfolipase A₂ (com aumento nas taxas de ácidos graxos livres), enzima esta que converte a xantina-desidrogenase em xantina-oxidase, fonte de ânion superóxido. Paralelamente, o metabolismo de ADP em anaerobiose se realiza até a síntese de AMP, de adenosina, de inosina e de hipoxantina (BULKLEY, 1987).

Todas estas perturbações celulares são reversíveis, no entanto, no momento da reperfusão, as células isquêmicas são submetidas a um “estresse oxidativo” que irá acelerar sua destruição (BULKLEY, 1987).

Durante a reperfusão, a produção de radicais livres na zona isquêmica é intensa e os sistemas de proteção estão deprimidos (diminuição das taxas de SOD, catalase e glutathione peroxidase) (BULKLEY, 1987).

A superprodução de radicais durante a reperfusão pode ocorrer devido a ativação dos neutrófilos polimorfonucleares acumulados na zona isquêmica (acelerando o consumo de oxigênio e ativando a NADPH-oxidase da membrana), o que origina uma produção e difusão extracelular de radicais livres; por reação dos produtos do metabolismo anaeróbico, ou seja, hipoxantina e xantina oxidase, os quais, em presença do oxigênio, formam a xantina e o ânion superóxido, o qual reage com óxido nítrico para formar peroxinitrito; por transformação do ácido aracdônico acumulado durante a fase isquêmica, originando a síntese de

endoperóxidos e a produção de radicais livres (BULKLEY, 1987; SAMDAMI *et al.*, 1997).

Os radicais livres formados durante a reperfusão (O_2 e H_2O_2 transformados em OH) reagem com as membranas celulares fosfolipídicas (resultando em alterações na fluidez, aumento da permeabilidade e perda da integridade da membrana), proteínas e ácidos nucleicos, provocando a desorganização estrutural e funcional da célula e sua morte. Eles atuam sobre os ácidos graxos livres acumulados durante a fase isquêmica e podem desviar a cascata do ácido araquidônico em direção à via metabólica vaso-constrictora e pró-agregante do tromboxano A_2 . Estes radicais são agentes quimioatrativos para as plaquetas (adesão e agregação) e os neutrófilos polimorfonucleares, os quais ativam a aderência ao endotélio e somam sua própria produção de radicais (BULKLEY, 1987).

Os radicais livres oriundos da isquemia tissular contribuem ao agravamento desta, seja exercendo seus efeitos negativos diretamente (oxidação de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos) ou induzindo um colapso microcirculatório por ação sobre o endotélio vascular, plaquetas e neutrófilos (diminuição das taxas de prostaciclina e aumento das taxas de tromboxano A_2), tais reações originam o fenômeno de não-reperfusão que se observa durante os reimplantes cirúrgicos (BULKLEY, 1987).

Estudos experimentais têm demonstrado que radicais livres de oxigênio e peroxidação lipídica exercem importante papel na patogênese da lesão gástrica aguda induzida pela isquemia-reperfusão. O sistema xantina oxidase tem sido proposto como fonte primária destes radicais, seguido pelos neutrófilos. A estimulação do metabolismo oxidativo neutrofílico resulta na liberação de grandes quantidades de O_2 , H_2O_2 e H^+ . Em adição, neutrófilos secretam a enzima mieloperoxidase no meio extracelular, onde esta catalisa a oxidação de CL^- pelo H_2O_2 para produzir o potente oxidante citotóxico ácido hipocloroso (HOCL) e N-Cloraminas (ALARCÓN DE LA LASTRA *et al.*, 1995).

A glutathione, um antioxidante encontrado em altas concentrações no fígado (KAPLOWITZ *et al.*, 1985), neutraliza vários tipos de radicais, diretamente ou em associação com a glutathione peroxidase. Estudos prévios mostram que a glutathione é consumida durante a isquemia de reperfusão, indicando geração de radicais livres (STEIN *et al.*, 1991). Porém a relação entre as alterações neste sistema e a fase isquemia-reperfusão não foi totalmente elucidada (ERDEN & BOR, 1984; BORREGAARD *et al.*, 1987).

Durante o período de reperfusão após a isquemia, a suspensão parcial ou completa do fluxo sanguíneo ocorre em vários leitos vasculares. Tem sido sugerido que o fenômeno de não refluxo na reperfusão da isquemia hepática resulta de ligação microvascular de capilares ou sinusóides com leucócitos e plaquetas agregadas. O ânion superóxido também pode contribuir para este fenômeno (KOO *et al.*, 1991).

A prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente de ânions superóxido que durante a fase de reperfusão reagem com óxido nítrico para formar peroxinitrito (SAMDANI *et al.*, 1997), pela utilização de estratégias que neutralizem estes ânions ou que inibam seletivamente a óxido nítrico sintase promovem proteção contra o desenvolvimento de injúria do órgão (DALKARA & MOSKOWITZ, 1997)

1.10. Permeabilidade Intestinal

A mucosa gastrointestinal executa duas importantes tarefas, cada uma tem suprema importância para o organismo. Primeiro, a mucosa participa na digestão, absorção e ingestão de nutrientes, água e eletrólitos; segundo é constituída de uma eficiente barreira que impede a entrada de componentes químicos potencialmente tóxicos, exemplo: agentes tóxicos, imunogênico ou carcinogênico que são barrados na parede intestinal. As junções firmes que unem as células

epiteliais são de fundamental importância para manter a integridade da barreira (POWELL, 1981; HOLLANDER, 1992). Alguns estudos sugerem que estas junções são de fato, dinâmicas e podem ser reguladas por vários fatores intraluminais que têm relação fisiológica ou patológica (MADARA, 1988; MADARA, 1990; PAPPENHEIMER *et al.*, 1994). Todavia, a importância nutricional por via paracelular de absorção é controversa (SOERGAEL, 1993; MADARA, 1994), e é mais aceito que moléculas potencialmente nocivas penetrem a lâmina própria do intestino através desta via controlável (SADOWSKI & MEDDINGS, 1993). Em algumas situações de intestino inflamado, a permeabilidade das junções firmes está marcadamente aumentada, até mesmo quando o epitélio apresenta-se morfollogicamente aderente (MADARA, 1990). O aumento primário da permeabilidade macromolecular, é um fator controverso na etiologia das Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) (PEETERS *et al.*, 1994). Clinicamente, o grau de inflamação intestinal (e resposta ao tratamento) pode ser monitorado pela permeabilidade de moléculas teste que servem como marcador para o transporte paracelular (HOLLANDER, 1992; PEETERS *et al.*, 1994)

1.11. Cicatrização

Os eventos da fase inicial da cicatrização de feridas são desencadeados quando vasos sangüíneos são rompidos, resultando em hemorragia onde há rompimento da barreira epidermal da pele e dano às estruturas subjacentes. A hemorragia tem que ser estancada para que o restante do processo de cicatrização prossiga; isso ocorre através da formação de um coágulo que tampona os vasos danificados. O coágulo consiste de uma rede de fibrina com plaquetas agregadas e embutidas no interstício, que aprisiona células vermelhas que se transformam em outro componente do tampão de coágulo (GRINNELL, 1984).

Além de contribuir para a hemostasia, a fibrina também possui um componente primário da matriz provisional, que se forma na ferida durante o período inicial de cicatrização. Ela fica recoberta com fibronectina a partir dos derivados do soro e plaquetas agregadas. Fibronectinas são uma classe de

glicoproteínas que facilitam a fixação de células migratórias na rede de fibrina, sendo um componente extremamente importante tanto para a matriz primária como para a derme madura (HYNES, 1986). Durante a fase inicial da cicatrização, a fibronectina auxilia na adesão celular e modula a migração de vários tipos de células para a ferida (GRINNELL, 1984). Em adição, a rede de fibrina-fibronectina adere várias citocinas liberadas no momento da injúria, servindo como um reservatório desses fatores para os futuros estágios da cicatrização (WYSOCKI & GRINNELL, 1990).

Tanto a trombina quanto a fibrina têm efeitos sobre mecanismos adicionais da cicatrização. A trombina estimula a permeabilidade vascular observada após a lesão e também facilita a migração extravascular de células inflamatórias (ESMON, 1993). A fibrina pode também atuar na epitelização e na angiogênese. Ela age como um andaime para a migração de células mesenquimais e inflamatórias (TANAKA & SLTEISHI, 1993).

A agregação plaquetária ocorre quando estas são expostas ao colágeno extravascular (SANTARO, 1986). Essa agregação leva à liberação de citocinas de grânulos alfa do citoplasma de células plaquetárias. Estas citocinas incluem PDGF, TGF- β , TGF- α , bFGF, PDEGF e PDECGF. Algumas dessas citocinas têm um efeito direto na fase inicial do processo de cicatrização e outras têm um papel crucial nos aspectos tardios da cicatrização, por sua ligação com a rede de fibrina (LAWRENCE, 1998).

O dano tecidual no sítio da injúria estimula a resposta inflamatória que se inicia rapidamente após a ferida ser criada. A resposta inflamatória aciona eventos que têm implicações com todo o processo de cicatrização. Na cicatrização normal, as mudanças que ocorrem no tecido com o tempo são extremamente reproduzíveis. Após a hemostase ter sido completada, células inflamatórias migram para ferida com a predominância inicial de neutrófilos. Em 48 a 72 horas

macrófagos começam a superar o número de neutrófilos, e há uma quantidade de macrófagos que permanece na ferida por vários dias. É crítico que macrófagos, e não neutrófilos, sejam essenciais para cicatrização normal. Após 5 a 7 dias, poucas células inflamatórias permanecem na ferida com cicatrização normal, e os fibroblastos tornam-se o tipo de célula predominante (LAWRENCE, 1998).

Recentemente, os neutrófilos têm sido reconhecidos como produtores de citocinas pró-inflamatórias que funcionam como um dos primeiros sinais para a ativação dos fibroblastos locais e queratinócitos, apesar de ter-lhe sido inicialmente atribuído apenas um papel na defesa fagocítica (HUBNER & GRISELDI, 1996). O número de neutrófilos aumenta entre 24 a 48 horas depois de ocorrida a lesão. Na ausência de contaminação substancial, a infiltração de neutrófilos cessa após vários dias e seu número decai rapidamente. Além disso, depois de alguns dias os neutrófilos presos no coágulo são perdidos junto com a crosta que se desprende, sendo que aqueles remanescentes dentro dos tecidos viáveis se transformam em senescentes e são fagocitados pelos macrófagos teciduais (NEWMAN, HENSON & HENSON, 1982).

Quando monócitos migram dos capilares para o espaço extravascular transformam-se em macrófagos, em um processo mediado por fatores do soro (NEWMAN, HENSON & HENSON, 1982) e fibronectina (WRIGHT & MEYER, 1985). A maneira exata como eles se diferenciam é baseada num estímulo do tecido para o qual ele é recrutado (KESHAR & STEIN, 1992). Fatores quimiotáticos estão envolvidos na estimulação da migração de macrófagos para a área da ferida (SNYDERMAN & FUDMAN, 1980). Os fatores específicos que estimulam a migração de macrófagos, que incluem fragmentos de colágeno, fragmentos de fibronectina e elastina, têm derivados da matriz lesionada, como também componentes do complemento.

Monócitos aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos e migram para tecido de uma maneira similar aos neutrófilos. Uma vez no espaço extravascular liga-se a proteínas da matriz extracelular, através de receptores para integrinas

(DOHERTY *et al*, 1987). Eles então expressam fator 1 de estimulação de colônia, que contribui para sua sobrevivência. Uma vez na matriz provisional, os macrófagos são ativados através da estimulação pela interleucina 2 (IL-2) e interferon sigma (INF-sigma), derivados de linfócitos T, como também por estímulo viral ou bacteriano (ADAMS & HAMILTON, 1984). PDGF pode também estimular a ativação de macrófagos (TZENG *et al*, 1985).

Os macrófagos são muito importantes na cicatrização normal de feridas. Macrófagos fagocitam bactéria e tecido morto e, também, secretam collagenase e elastases que quebram a matriz danificada (WERB, BANDA & JONES, 1980). Também secretam um inibidor tecidual de metaloproteinase, sugerindo sua habilidade para regular firmemente a quebra de tecido e a remodelação (STRICKLIN *et al*, 1993). Os macrófagos são a fonte primária de citocinas que estimula a proliferação de fibroblastos, a produção de colágeno e outros processos de cicatrização. Macrófagos também produzem prostaglandinas, metabólitos do oxigênio e carragenina, que são reguladores adicionais para a resposta da cicatrização. O TGF- β regula a sua própria produção por macrófagos de forma autócrina. Estimula também os macrófagos a secretarem várias outras citocinas, incluindo FGF, PDGF, TNF- α , e IL-1 (LAWRENCE, 1998).

Material estranho ou bactérias podem mudar o cenário da cicatrização normal para um quadro de inflamação crônica. Apesar das fases agudas da inflamação serem necessárias a persistência da inflamação pode ser deletéria para o hospedeiro. Após a morte, neutrófilos liberam enzimas proteolíticas destrutivas e radicais livres do oxigênio os quais lesam o tecido. Os produtos advindos da clivagem do complemento junto aos produtos intermediários do metabolismo dos radicais peróxidos derivados de neutrófilos contribuem para a formação de complexos citotóxicos de ataque a membranas que perpetuam a destruição tecidual. Essa injúria, mediada por neutrófilos, pode contribuir para o dano tecidual progressivo decorrente de queimaduras e reperfusão, após períodos de isquemia contribuindo com problemas observados como resultado de inflamação crônica induzida por corpos estranhos persistentes e infecção crônica (LAWRENCE, 1998).

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são um problema de saúde pública em muitos países. Suas etiologias permanecem mal definidas. Nos Estados Unidos a incidência de colite ulcerativa é de 11 para cada 100.000 habitantes e de Doença de Crohn de 7 para cada 100.000 habitantes. Drogas de primeira escolha como os corticosteróides manifestam seus efeitos colaterais com o uso prolongado, frequentemente tem o aparecimento de hipertensão arterial, diabetes e osteoporose. Uma vez que o óleo-resina da Copaíba (ORCL) é utilizado popularmente como antiinflamatório e na cicatrização de feridas e úlceras, resolvemos avaliar o potencial antiinflamatório do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* Desf (ORCL) e do seu constituinte Ácido Kaurenóico (AK) em modelos animais representativos de DIIs em humanos, a fim de possibilitar a utilização terapêutica de um fitoterápico com controle e qualidade na saúde primária.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial da ação inibitório do ORCL nos modelos experimentais de colite ulcerativa induzida por ácido acético, TNB e indometacina, e no modelo de isquemia-reperfusão intestinal.
- Esclarecer o envolvimento de fatores defensores (glutathiona), enzimas (catalase, mieloperoxidase) e substâncias envolvidas no processo de injúria (nitrito, malonaldeído).
- Analisar de forma macroscópica e microscópica as lesões.
- Avaliar a atividade cicatrizante do ORCL e AK nos modelos experimentais de feridas abertas e por incisão.

3.MATERIAL

3. MATERIAL

3.1. ANIMAIS

Todos os animais utilizados nos experimentos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no Laboratório setorial em caixa de propileno a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12h, tendo acesso livre à água e ração Purina.

- Ratos albinos, *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, adultos, de ambos os sexos e pesando 150-300g.
- Camundongos albinos, *Mus musculus*, variedade Swiss-webster, adultos, de ambos os sexos e pesando 20-30g.

3.2. DROGAS, REAGENTES E CORANTES

Ácido Etilenodiaminotetraacético Sal Dissódico (EDTA)	PROANALYSI
N-Acetilcisteína	Fluimucil®-EUROFARMA
Ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico - DTNB	SIGMA
Ácido acético glacial P.A.	SYNTH
Ácido fosfórico	SIGMA
Ácido tiobarbitúrico	SIGMA
Ácido tricloroacético P.A.	SIGMA
Ácido trinitrobenzeno sulfônico	SIGMA
Albumina Bovina Sérica - BSA	REAGEN
Álcool etílico absoluto P.A.	QUIMEX
Azul de Evans	REAGEN, BRASIL
Brometo de hexadeciltrimetilamônio -HTAB	SIGMA
Cetamina	Ketalar®-PARKE DAVIS
Citrato de sódio – $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	REAGEN

Cloreto de potássio	SYNTH
Cloreto de sódio	CINÉTICA
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	QUIMEX
Dimetilsulfóxido - DMSO	VETEC
Éter etílico comercial	PRO ANALYSIS
Folin Ciocaltean	QEEL
Formaldeído	REAGEN
Formamida	SIGMA
Glicose	VETEC
Glutation reduzido	SIGMA
Hematoxilina e Eosina	NEWPROV®
Hidrocloreto de o-diasidine	SIGMA
Hidróxido de sódio	REAGEN
Indometacina	SIGMA
Malonaldeído	SIGMA
Mieloperoxidase	SIGMA
Na_2CO_3	VETEC
Naphthylenediamina	SIGMA
n-butanol	LAFAN
Nitrogênio líquido	WHITE MARTINS
Parafina	SYNTH
PBS	
Peróxido de hidrogênio	VETEC; KONIG, ARG.
Sulfanilamida	SIGMA
Tampão tris	SIGMA
TNB	SIGMA
Tween 80	RIEDEL, ALEMANHA
Xilasina	ROMPON, BAYER

3.3. EQUIPAMENTOS

Aagitador de tubos-VORTEX	PHOENIX AP56
Aagitador - Aquecedor	FANEN 258
Balança analítica	MARTE AL 200
Balança para animais	FILIZOLA
Banho Maria	QUIMIS
Centrífuga refrigerada	CIENTEC CT 5500 DR
Elisa	PACKARD SPECTRA COUNT
Espectrofotômetro	BAYER-RA 50 / BECKMAN DU640B
Freezer -75°C	LEGACI SYSTEM
Lavadora ultrasônica	UNIQUE USC 700
Microscópio	NIKON
pHmetro	ALALION-PM 608
Pipetas automáticas	JENCONS

3.4. MATERIAL BOTÂNICO

A *Copaífera langsdorffii* Desf. e seu óleo-resina foram coletados na localidade de Barreiro Grande, Crato-CE, identificada pela equipe do Professor Afrânio G. Fernandes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Amostras testemunhas das espécies medicinais encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra desta Universidade, estando a exsicata da *Copaífera langsdorffii* Desf., registrada sob o número 24.461 (**FIGURA 6**). O óleo-resina obtido do caule da planta foi analisado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, pela equipe do professor Edilberto R. Silveira.

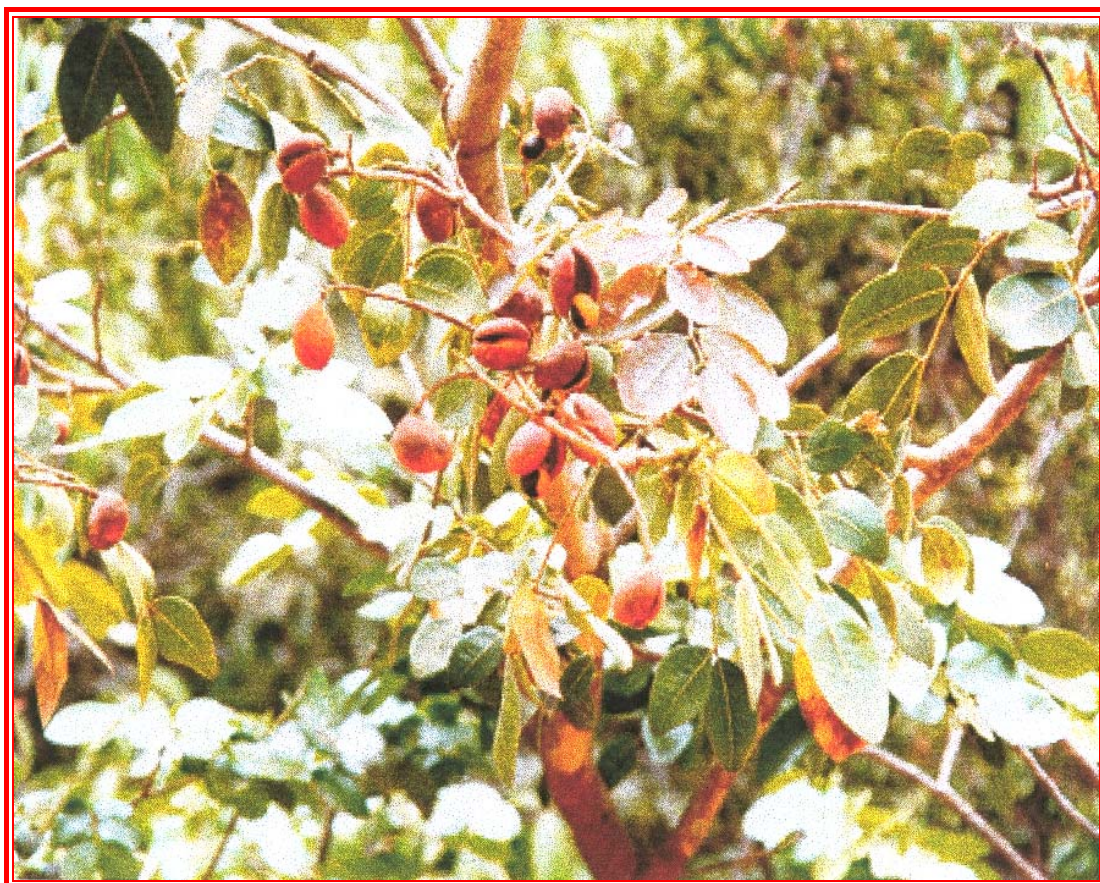


FIGURA 6- Foto da *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae)

Local da coleta: localidade de Barreiro Grande, Crato-CE

Exsicata: 24.461

Depositada: Herbário Prisco Bezerra-UFC

4.MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO ÓLEO-RESINA DA *Copaifera langsdorffii* Desf.

O estudo químico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela equipe do Prof. Dr. Edilberto R. Silveira.

4.1.1. Estudo espectrométrico de RMN

O ORCL foi analisado por espectrometria da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C).

4.1.2. Estudo cromatográfico

Foi realizada a cromatografia do óleo-resina sobre gel de sílica.

4.1.3. Estudo da fração volátil

Do óleo-resina, 36,8g foram submetidos a extração da fração volátil por hidrodestilação, fornecendo 2,7g (7,3%) de óleo essencial de coloração amarela-clara.

Os constituintes do óleo essencial, foram identificados por interpretação do cromatograma, índice de Kovats e comparação visual dos espectros de massa com padrões da literatura (ADAMS, 1989)

4.1.4. Identificação do Ácido Kaurenóico

A identificação do ácido Kaurenóico foi efetuada a partir de métodos espectrométricos (IV, EM e RMN).

4.1.5. Isolamento do Ácido Kaurenóico

Tratamentos cromatográficos sucessivos da fração ácida em sílica gel e eluição com aumento gradual de polaridade da fase móvel.

4.2. Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos (MASCOLO *et al.*, 1995)

Embora o modelo de colite induzida por ácido acético seja claramente tóxico, é provável que a resposta inflamatória resultante seja devida ao produto do influxo de conteúdo luminal para a lâmina própria decorrente da destruição das células epiteliais com perda da barreira epitelial entre as células imunológicas da lâmina própria e os antígenos do lúmen. E, apesar de diferente daquele que se encontra na colite ulcerativa, onde o evento iniciador é uma ativação das células imunológicas da lâmina própria que levam a um dano das células epiteliais, ambas as situações mostram uma surpreendente semelhança quando se examina o padrão do metabolismo do ácido araquidônico. Nas duas situações, tanto os produtos da lipoxigenase como da cicloxigenase são igualmente dependentes da infiltração dos neutrófilos, seja na colite ulcerativa ou na mediada por ácido acético (FABIA *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1992; FABIA *et al.*, 1993). Como a colite induzida é precoce e aguda é possível sua utilização no estudo desta fase da doença a fim de investigar qual ou quais componentes da doença inflamatória intestinal são produtos de um componente inflamatório agudo bem como avaliar a eficácia farmacológica de novas drogas nesta fase da doença.

Ratos Wistar (150-200 g), machos, em jejum de 36 horas, n=6 animais dividido em 11 grupos: 1. Controle não tratado; 2. Controle veículo (2% de tween 80); 3. Controle veículo AK (3% de DMSO); 4. ORCL (200mg/kg); 5. ORCL (400mg/kg); 6. AK(50mg/kg); 7. AK(100mg/kg), foram tratados por via oral 24 e 2h antes da administração de ácido acético (2mL via retal, 4%); 8. ORCL (200mg/kg); 9. ORCL (400mg/kg); 10. AK(50mg/kg); 11. AK(100mg/kg), foram tratados por via retal 24 e 2h antes da administração de ácido acético (2mL via retal, 4%). Os animais foram anestesiados com éter e o ácido acético foi instilado no cólon, a 8cm do ânus do animal por meio de uma sonda. 24h após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de 8cm do cólon a partir do ânus e desprezados 3cm

proximais. Os 5cm do cólon foram abertos longitudinalmente, limpos com solução salina (0,9% NaCl) e avaliados macroscopicamente para aferição de escores, de acordo com WALLACE *et al.*, 1989, (0=aparência normal; 1=hiperemia focal sem úlcera; 3=ulceração com inflamação, único local; 4=dois ou mais sítios com discreta ulceração e inflamação; 5=sítios maiores de injúria e inflamação com extensão de 1-2cm ao longo do comprimento do cólon; 6-10= o escore aumenta de 1 por cada cm adicional de dano ou injúria, além de 2cm). Foi avaliado também o peso úmido do tecido. Após pesagem, 300mg de tecido foram separadas para dosagem de mieloperoxidase, 200mg para dosagem de malonaldeído, nitrito e catalase, e com tecido restante realizado análise histológica.

4.3. Colite ulcerativa induzida por TNB (ácido trinitrobenzeno sulfônico) em ratos MORRIS *et al.*, 1989.

A colite induzida por TNB é um modelo experimental bastante utilizado para se fazer o “screening” de drogas com ação nas doenças inflamatórias intestinais humanas (WALLACE, 1988; YOSHIKAWA *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1999) onde os mediadores inflamatórios mais comuns são as espécies reativas de oxigênio, aminas vasoativas e os eicosanóides que têm um importante papel (SEO *et al.*, 1995; LOGUERCIO *et al.*, 1996; CARTY *et al.*, 2000).

Ratos Wistar (150-200 g), machos, em jejum de 60 horas, receberam água glicosada 0,5%, n=6 animais divididos em 4 grupos: 1. Controle não tratado; 2. Controle veículo TNB (2% de tween 80); 3. ORCL (400mg/kg); foram tratados por via oral, 2, 24 e 48h após a indução da colite; 4. ORCL (400mg/kg); foram tratados por via retal, 2, 24 e 48h após a indução da colite. A inflamação do cólon foi induzida após uma leve anestesia com éter, com uma única administração intracolônica de 0,25 mL de etanol 50% contendo 20 mg de TNB. A solução foi administrada através de um cateter (0,3 mm de diâmetro) introduzido a 8 cm do ânus. Setenta e duas horas após a indução da colite, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de 8cm do cólon a partir do ânus (cólon distal) e desprezados 3cm proximais. Os 5cm do cólon foram abertos longitudinalmente, limpo com solução salina (0,9% NaCl) e avaliado macroscopicamente para aferição de escores (WALLACE *et al.*, 1989), (0=aparência normal; 1=hiperemia focal sem úlcera; 3=ulceração com inflamação, único local; 4=dois ou mais sítios com discreta ulceração e inflamação; 5=sítios maiores de injúria e inflamação com extensão de 1-2cm ao longo do comprimento do cólon; 6-10=o escore aumenta de 1 por cada cm adicional de dano ou injúria, além de 2cm). Foi avaliado também o peso úmido do tecido. Após pesagem, 300mg de tecido foram separadas para dosagem de mieloperoxidase, 200mg para dosagem de malonaldeído e catalase e com o tecido restante realizado a análise histológica.

4.4. Injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão em ratos. (KIMURA *et al.*, 1998)

O intestino delgado é altamente sensível a injúria causada pela isquemia-reperfusão (I/R), que é clinicamente associada com alta morbidade e mortalidade. A I/R envolve uma complexa resposta inflamatória, que inclui ativação do sistema complemento, agregação dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), e produz um aumento no número de radicais livres derivados do oxigênio, os quais são responsáveis por danos teciduais. (GRISHAM *et al.*, 1986; SIMPSON *et al.*, 1993; SCHWARZ *et al.*, 1999; BALOGH *et al.*, 2002). Os eventos moleculares que ocorrem com a injúria causada pela I/R incluem perda de aminoácidos, proteínas transportadoras de membrana, enzima citocromo e ácido nucléicos, induzindo a lesão da mucosa, diminuição da função intestinal e aumento da permeabilidade de bactérias e endotoxinas, levando a uma resposta inflamatória sistêmica (HALLIWELL *et al.*, 2000).

Ratos Wistar (150-200 g), machos, em jejum de 36 horas, n=6 animais dividido em 6 grupos: 1. Controle não tratado; 2. Controle veículo (2% de tween 80); 3. ORCL (200mg/kg); 4. ORCL (400mg/kg); 5. AK(50mg/kg); 6. AK(100mg/kg); foram tratados por via oral, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia. Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilasina (35mg/kg) (0,05mL/animal, i.m.), foi então realizada laparotomia, clampeada a artéria mesentérica superior por 45min, após este tempo foi retirado o clampe e liberado a reperfusão por uma hora. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Foi retirado o intestino delgado, separado o íleo e lavado em salina gelada, 300mg de tecido para dosagem de mieloperoxidase, 200mg para dosagem do malonaldeído, 400mg para dosagem de catalase e nitrito, 500mg para dosagem da glutatona e com tecido restante realizado a análise histológica.

4.5. Inflamação intestinal induzido por indometacina em ratos. (RUH *et al.*, 1998)

A indometacina é um dos mais efetivos DAINES utilizados na clínica para o tratamento das doenças reumáticas e artrite, porque tem ação analgésica, antipirética e antiinflamatória. Estas ações são mediadas pela completa inibição da atividade da e PG H sintase (VANE 1971; KULMACZ & LANDS, 1985). Contudo, os efeitos da indometacina causam danos à mucosa gastrointestinal (GARCIA RODRIGUES & JICK, 1994; HAWKEY, 1996). Na mucosa gástrica a injúria induzida pela indometacina é mediada pela peroxidação lipídica e radicais livres que causam danos e destroem as células da membrana (NAITO *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 1996).

Ratos Wistar (150-200 g), machos, em jejum de 36 horas, n=6 animais, dividido em 5 grupos: 1. Controle não tratado; 2. Controle veículo (2% de tween 80); 3. ORCL (200mg/kg); 4. ORCL (400mg/kg); 5. AK(100mg/kg); foram tratados por **via oral**, 12 e 2 horas antes do tratamento com indometacina (20mg/kg, s.c.). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 12 horas após a administração da indometacina, foi então realizada laparotomia, retirado o intestino delgado, lavado em salina gelada, 300mg de tecido foi separada para dosagem de mieloperoxidase, 400mg para dosagem de nitrito.

4.6. Aumento na permeabilidade induzido por indometacina (LANGE & DELBRO, 1995)

LANGE *et al.*, 1994, demonstraram que um método rápido de determinar a permeabilidade paracelular no intestino é instilando um marcador intraluminal. Como substância teste ele utilizou o corante, azul de Evans (AE).

Camundongos Swiss machos (32-35g) tratados com ORCL (200 e 400mg/Kg, v.o., 2 horas antes) ou AK (50 e 100mg/Kg, v.o., 2 horas antes) ou indometacina (20mg/Kg, v.o., 6 horas antes) ou rofecoxib (5mg/Kg, v.o., 6 horas antes) foram anestesiados com uma solução contendo cloridrato de xilasina (35mg/Kg) e cetamina (100mg/Kg) no volume de 0,05mL/animal (i.m.). Através de laparotomia foram isoladas 6 alças intestinais de 5cm cada, sendo a primeira a 7cm de distância da cárdia. Em cada alça foi injetado 0,1mL de solução de azul de Evans (3% em PBS). Uma hora depois os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as alças foram dissecadas e abertas longitudinalmente para a retirada do seu conteúdo interno. Estas foram então lavadas em beckers consecutivos, por um minuto em cada um dos beckers contendo 6mM de acetilcisteína em PBS. A parte medial de cada alça foi removida (15mm), enxugada gentilmente em papel de filtro, pesada e encubada com 3mL de formamida a 50°C por 24h. A quantidade de corante eluido foi estimada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 612nm.

4.7. Atividade cicatrizante

O óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) é utilizado popularmente na cicatrização de feridas e úlceras, portanto, resolvemos avaliar esta atividade.

O processo de reparação de tecido humano combina mecanismos de reparação e regeneração tecidual. Na reparação tecidual uma cicatriz é gerada, formando um remendo no sítio da lesão, muitas vezes associada à perda de função. Regeneração tecidual, ao contrário, envolve a recriação do tecido na forma em que ele existia antes da injúria, com pequena ou nenhuma perda de função. O equilíbrio entre reparo e regeneração em resposta à injúria é ligeiramente diferente em cada tipo de tecido. Apesar de alguns componentes do processo de cicatrização possuírem mecanismos regenerativos, a pele é um exemplo de tecido no qual a resposta à injúria é predominantemente reparativa (LAWRENCE, 1998).

Devido à liberação diferenciada de cada uma das citocinas envolvidas neste processo é possível dividi-lo em fase inicial, intermediária, tardia e final. Cada fase caracteriza-se por eventos biológicos específicos. A fase inicial da cicatrização envolve inflamação e estabelecimento da hemostasia. A fase intermediária caracteriza-se primariamente por proliferação e migração de células mesenquimais, epitelização e angiogênese. Os eventos centrais da fase tardia da cicatrização incluem a síntese de colágeno e outras proteínas de matriz e a contração da ferida. Remodelação da ferida predomina na fase final de cicatrização (LAWRENCE, 1998).

4.7.1. Ferida aberta (MORTON & MALON, 1972)

Três grupos de ratos contendo seis animais por grupo foram depilados e então anestesiados para retirada de 2cm² de pele. Os animais foram mantidos em gaiolas separadas. A contração da pele foi calculada pela redução de área descoberta por pele. As mudanças no tamanho de área da lesão foram medidas

por planimetria em mm² num plástico transparente. O ORCL (100μL na concentração de 2 e 4%) ou o veículo (100μL com 4% de tween 80 em salina) foram aplicados topicamente, todos os dias por um período de 21 dias. A contração da pele foi expressa em percentagem de redução da área original.

4.7.2. Ferida por incisão (UDUPA *et al.*, 1994)

Três grupos de seis animais cada foram depilados, anestesiados e feitos uma incisão linear, esta foi suturada com fio de nylon a cada um centímetro e os animais foram mantidos em gaiolas individuais. A sutura foi removida um dia antes do tecido ser submetido à tensão. Os animais receberam tratamento tópico com veículo (100μL com 4% de tween 80 em salina) ou ORCL (100μL na concentração de 2 e 4%) duas vezes ao dia (10.00 a.m. e 6.00 p.m.) e foram sacrificados após 5, 7 ou 12 dias da cirurgia. A pele contendo a incisão foi retirada e exercida uma tensão (g) de acordo com NAGI & ZINGG (1971) e expresso em g/cm.

4.8. Ensaio para atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ *et al.*, 1984)

A mieloperoxidase (MPO, peróxido de hidrogênio oxidoreductase) é uma enzima amplamente distribuída no organismo e suas fontes fundamentais são os leucócitos (neutrófilos, monócitos e os macrófagos) apesar de ter sido isolada de muitos fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial e sêmen, entre outros) (YAN, *et al.*, 1992; EDWARDS *et al.*, 1988; WOLFF *et al.*, 1992). E também em diferentes tecidos (coração, rins, pele, fígado e placenta) (KARGER, *et al.*, 1994; JOHNSON, *et al.*, 1987; BRADLEY, *et al.*, 1982; KOMATSU, *et al.*, 1992; JOSEPH *et al.*, 1993). No entanto, a fonte mais comum são os neutrófilos, onde a enzima se encontra localizada a nível lisossomal. Constituindo de 2-5% do conteúdo de proteínas destas células (MARQUEZ *et al.*, 1990).

O sistema MPO-peróxido de hidrogênio (H_2O_2)-ferro tem sido um sistema bem estudado (KETTLE *et al.*, 1992; KETTLE & WINTERBOURN, 1994). A reação da MPO com o H_2O_2 proveniente das células fagocitárias ativadas por partículas estranhas, formam um complexo enzima-substrato com uma forte capacidade oxidativa. Este complexo se combina com o ferro, geralmente cloroso, que se oxida para formar o ácido hipocloroso (HOCL). O ácido hipocloroso é um potente agente oxidativo que contribui com o mecanismo de defesa contra os agentes infecciosos, mas também pode atuar sobre as células do hospedeiro. O HOCL pode causar muitos danos em enfermidades inflamatórias (KETTLE & WINTERBOURN, 1994).

O aumento da atividade da MPO é relatado em vários processos patológicos e está associado com o aumento do estresse oxidativo, como no caso das enfermidades infecciosas, inflamatórias e isquemia-reperfusão. Nestes casos se demonstrou um aumento significativo da atividade da mieloperoxidase, em proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto, se pode utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (SIMPSON & FANTONE, 1988; KOMATSU, *et al.*, 1992; NALINI *et al.*, 1993;

WILSON *et al.*, 1993; PERALTA *et al.*, 1993; JUNGER *et al.*, 1993; OVER *et al.*, 1993; VENGE, 1994)

Amostras do cólon (300 mg) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em uma solução de brometo de haxadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM (HTAB, pH 6, 1 mL por 50 mg de tecido). O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento, 5 min (-70 °C) e descongelamento (água a 37 °C). As amostras foram então centrifugadas (4000 rpm, 15 min, 4 °C) para remover o material insolúvel. A MPO contida no sobrenadante (0,1 mL) foi analisada espectrofotometricamente após a adição de 2,9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 6) contendo 0,167 mg/mL de hidrocloreto de *o*-dianisidine e 0,0005 % de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudanças na absorbância a 470 nm foram medidas no tempo 0 e 5min.

4.9. Ensaio para dosagem de Malonaldeído (MDA) (UCHIYAMA & MIHARA, 1978)

Os radicais livres de oxigênio podem provocar distúrbios nos sistemas biológicos por afetarem uma variedade de seus constituintes moleculares (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA). Resíduos de ácidos graxos poliinsaturados nas proteínas apresentam uma estrutura química que os torna alvo particularmente vulneráveis para a oxidação pelos radicais livres (peroxidação de lipídios). A peroxidação de lipídios é iniciada se um radical ingressa a fase lipídica e apresenta significativa reatividade para retirar um átomo de hidrogênio para um grupamento ($-CH_2$) do ácido graxo. Radicais hidroxila mas não ânions superóxido são capazes de promover peroxidação de lipídios. A presença de íons metálicos como o ferro, parece ser essencial para a iniciação da peroxidação de lipídios. Peróxidos lipídicos são instáveis, e tendem a se decompor rapidamente para formarem produtos secundários. Esses produtos secundários incluem alcanos como etano e pentano (que são detectáveis por cromatografia gasosa) e aldeídos como malonaldeído (que são detectáveis pela reação com o ácido tiobarbitúrico). Esses produtos são “per si”, tóxicos e podem ser responsáveis por muitos efeitos deletérios da peroxidação de lipídios.

Duzentos miligramas do cólon foram tomados e homogeneizados com uma solução gelada de KCL 1,15% (homogenato a 10%). Quinhentos microlitros do homogenato foram transferidos para um tubo de ensaio e adicionados 3mL de H_3PO_4 1%, pH=2, e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Esta mistura foi fervida em banho-maria por 45min, a seguir resfriada em água gelada, adicionados 4mL de n-butanol, agitado em vortex por 1 min e centrifugado a 1200 rpm por 15 min. A fase butanólica foi tomada para leitura em espectrofotômetro a 520 e 535nm. A diferença das absorbâncias obtidas nas duas leituras foi utilizada para calcular o malonaldeído, baseada no coeficiente de extinção molar de 13.700M/cm.

4.10. Dosagem do nitrito (CHEN *et al.*, 2000)

A liberação excessiva de intermediários reativos de oxigênio pelos neutrófilos está implicada no mecanismo fisiopatológico de uma variedade de condições inflamatórias, agudas e crônicas, como por exemplo, sepse bacteriana, síndrome da angústia respiratória no adulto, doenças intestinais, doenças reumáticas e vasculite de diferentes etiologias (MALY & SHURER-MALY, 1995)

A concentração do nitrito foi medida tendo com indicador a produção de NO de acordo com a reação de Griess. Foram misturados 100 μ L do sobrenadante a um mesmo volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0.1% naphthylethylenediamina em água); a absorbância foi medida à 560nm e determinado em ELISA.

4.11. Dosagem de Catalase (BEERS & SIZER, 1952)

A catalase (HALLIWELL, 1988) está localizada no interior dos peroxissomas (organelas celulares que desempenham um papel importante na desintoxicação de diversos produtos), sua função é de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

Foi misturado em cubeta de quartzo 980 μ L do meio [90mL (100 μ L de H₂O₂ em 100mL de H₂O milli-Q q.s.p.) + 5mL tampão TRIS (HCL 1M EDTA 5mM pH=8) + 4mL de H₂O milli-Q] para a reação com 20 μ L do homogenato. O sobrenadante do homogenato foi lido durante 6min em espectrofotômetro a 230nm em UV, zerado com H₂O destilada.

Concentração de proteínas totais (Método de Lowry)

Foram preparados tubos de ensaio, contendo 750 μ L de H₂O, 5 μ L da amostra, 500 μ L do reagente C [24mL do reagente A (Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1N) para 1mL do reagente B (0,5% de CuSO₄.5H₂O em 1% de citrato de sódio C₆H₅Na₃O₇.2H₂O), agitar], repouso por 10min, 50 μ L do reagente D (1mL do reativo Follin para 1mL de H₂O destilada), repouso por 30min, após, agitado e lido em espectrofotômetro a 750nm em onda visível, zerado com H₂O destilada. O padrão tinha 50 μ L de BSA (albumina bovina sérica).

4.12. Determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos SH-NP (Glutathione) (BOYD *et al.*, 1979)

A mucosa usualmente contém altas concentrações de glutathione reduzido (GSH), o principal componente do estoque endógeno de grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP) (BOYD *et al.*, 1979). De acordo com estudos prévios foi demonstrado que radicais livres citotóxicos e níveis baixos de compostos sulfidrílicos estão associados com danos teciduais gástricos (MILLER *et al.*, 1985; PARMAR *et al.*, 1988)

Quinhentos miligramas do íleo foram homogeneizados em 5mL de EDTA Na₂ a 0,02M gelado. A 4mL do homogenato foi adicionado 3,2mL de água destilada mais 0,8mL de ácido tricloroacético a 50%, agitados e filtrados. Foram retirados 2mL do filtrado e adicionados 4mL de tampão tris 0,4M (pH8,9) e 0,1mL de DTNB à 0.01M. A absorbância foi determinada dentro de 5min a 412nm. Um branco foi feito sem homogenato. A concentração de SH-NP foi calculada através da equação da reta de regressão obtida de uma curva de calibração de Glutathione reduzido (GHS) e expressa em μg de SH-NP/500mg de tecido.

4.13. Avaliação Histopatológica

Para verificação das alterações teciduais microscópicas do cólon foram realizados cortes histológicos de todos os grupos tratados. O tecido foi fixado em formaldeído tamponado 10 % e incluídos em parafina, os cortes foram obtidos através de micrótomo, corados em lâmina com hematoxilina-eosina e examinados a microscopia ótica. Dentre os critérios utilizados para histologicamente acessar o dano tecidual foi incluído a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, hemorragia, edema e necrose. Para quantificação da infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, as células foram contadas de acordo com o método de NYGARD *et al.*, (1994).

4.14. Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. Para comparação múltipla de dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do teste de Student-newman-Keuls e para dados não paramétricos o teste empregado foi o de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (KRUSKAL & WALLIS, 1952).

Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0.05 ($p < 0.05$). Os asteriscos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$) serviram para caracterizar o grau de significância estatístico (SNEDECOR, 1963).

5.RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO ÓLEO-RESINA DA *Copaifera langsdorffii* Desf.

O óleo-resina foi analisado por espectrometria da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C), onde foi identificado, além de uma fração sesquiterpênica, uma mistura de dois diterpenos, um furânico e outro caurênico, como constituintes majoritários.

A cromatografia sobre gel de sílica do óleo-resina permitiu a obtenção de duas frações (**QUADRO 1**):

- POLAR: o tratamento cromatográfico possibilitou o isolamento e identificação dos ácidos poliáltico (1) e caurenóico (2) e dos seus ésteres metílicos (3 e 4).
- APOLAR: apresentou uma mistura de terpenos identificados como caurenal (5), sesquiterpênico oxigenado (6), diterpenico furânico (7) e caurenol (8).

A análise por CG-EM do óleo essencial forneceu um cromatograma, cujos constituintes principais identificados estão no **QUADRO 2**.

A identificação do ácido caurenóico foi efetuada a partir de métodos espectrométricos (IV, EM e RMN).

O espectro na região do IV foi obtido em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras sólidas e filmes para os óleos. O espectro de massa foi obtido em espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP - 5971A, acoplado a cromatógrafo de gás-líquido, modelo HP - 5890A série II (CGL-EM), provido de coluna capilar DB-5 (dimetilpolisiloxano) com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,1 μm , utilizando um gradiente de aumento de temperatura do injetor de 35-180°C/4°C/min e 180 a 280°C/20°C/min. Para substâncias sólidas utilizou-se espectrômetro de massa VG Auto Spec da Fisious Instruments, modelo M,

operando em impacto eletrônico de 70eV, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos à temperatura ambiente, em espectrômetros Bruker Avance DRX-500 operando na frequência de hidrogênio a 500 MHz e na frequência do carbono a 125 MHz utilizando sonda dual de 5 mm, para experimentos unidimensionais ^1H e ^{13}C e bidimensionais de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY e NOESY e correlação heteronuclear HETCOR e COLOC. Para experimentos bidimensionais de correlação homonuclear com detecção inversa ^1H , ^1H -COSY e NOESY, de correlação heteronuclear HMQC e HMBC e com gradiente GS-COSY, GS-HMQC e GS-HMBC, utilizou-se sonda inversa multinuclear de 5 mm com z-gradiente e unidade de gradiente de 10 A, pertencentes ao Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (Cenauremn) da Universidade Federal do Ceará.

Os experimentos unidimensionais de RMN ^{13}C foram efetuados sob desacoplamento total de hidrogênios. Quantidades variadas de amostras foram dissolvidas em 0,5 mL de CDCl_3 e acondicionadas em tubos de RMN de 5mm. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN ^1H pelo pico do hidrogênio pertencente a fração de clorofórmio não deuterada (δ 7,24) e para RMN ^{13}C pelo pico central do tripleto a δ 77,0 do clorofórmio deuterado. O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado a partir da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) variando o ângulo de nutação (θ) de 45° , 90° e ou 135° .

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de microdeterminação Mettler provido de placa aquecedora modelo FP-52 e unidade de controle FP-5.

Utilizou-se Polarímetro digital Perkin-Elmer 341 para obtenção da rotação ótica e rotação específica.

Isolamento do ácido Kaurenóico: 103,8 g do óleo de copaíba foram submetidos à extração da fração volátil, fornecendo 17,4 g, (10,2 %) de óleo essencial e 88,4 g (85,2%) de resina. A resina resultante foi dividida em fração

ácida e fração neutra a partir de reação ácido-base com hidróxido de amônio, obtendo-se 19,2 g (21,8 %) de fração neutra e 66,8 g (75%) de fração ácida.

Tratamentos cromatográficos sucessivos da fração ácida em sílica gel e eluição com aumento gradual de polaridade da fase móvel permitiram o isolamento de 1,5 g (4,4%) de um sólido incolor, de ponto de fusão 176,1-176,2°C, solúvel em clorofórmio, $[\alpha]_D^{25} = -81^\circ$, cuja análise espectrométrica possibilitou a identificação deste composto como o de ácido caur-16-en-19-óico, obtido com hexano: acetato de etila 5%.

Dados Físicos:

FM = $C_{20}H_{30}O_2$

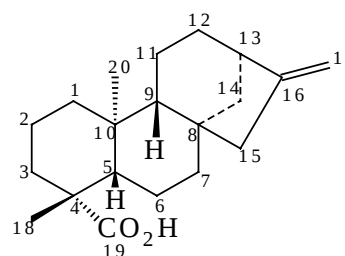
PM = 302

Ponto de Fusão = 176,1-176,2°C

Aspecto = Cristais incolores

Solubilidade = Clorofórmio

$[\alpha] = -81^\circ$



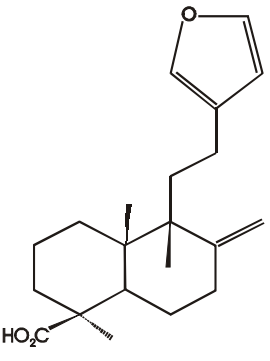
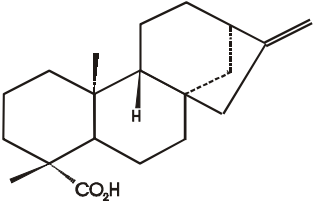
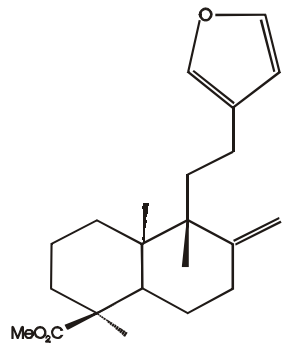
Ácido *ent*-Caur-16-en-19-óico

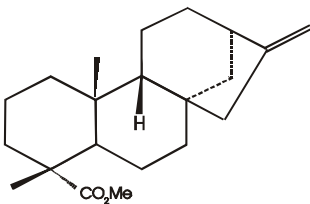
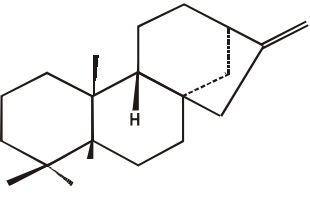
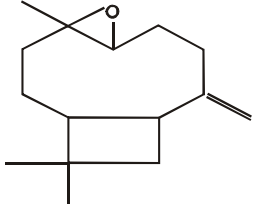
70

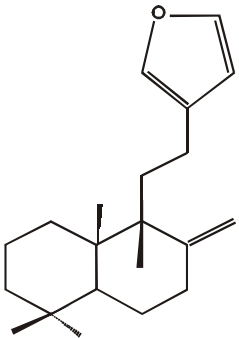
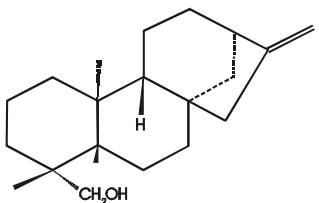
Espectrometria de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): (deslocamento químico em δ , multiplicidade, Integração e constante de acoplamento): 0,81(td; 1H; $J=13,3$; 4,0); 0,96 (sl; 3H); 1,00 (td; 1H; 13,5; 4,3); 1,05(m;1H); 1,06 (m; 1H); 1,14 (dd; 1H; 11,2; 4,9); 1,23 (sl; 3H); 1,41(m;1H); 1,42(m;1H); 1,47 (m; 1H); 1,54(m; 1H); 1,60 (m; 2H); 1,62(m; 1H); 1,84(m; 2H); 1,88(m; 2H); 1,98(dd; 1H; 12,8; 1,61); 2,04 (m; 2H); 2,15 (dm; 1H; 14,4); 2,62 (sl; 1H); 4,72 (s; 1H); 4,78 (s; 1H); 11,98 (bl; 1H);

Espectrometria de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): (deslocamento químico em δ): 40,8; 19,1; 37,8; 43,8; 57,2; 21,9; 41,3; 44,3; 55,2; 39,7; 18,5; 33,1; 43,9; 39,7; 49,0; 155,8; 103,0; 29,0; 184,6; 15,6.

QUADRO 1 – Estrutura química de constituintes isolados do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*.

		
1	2	3

		
4	5	6

	
7	8

QUADRO 2 – Constituintes químicos identificados no óleo essencial do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*.

COMPOSTO	IK	TEOR (%)
β -elemeno	1392	4.43
α -cis-bergamoteno	1396	4.56
β -cariofileno	1415	6.08
γ -elemeno	1431	2.20
α -trans-bergamoteno	1439	2.53
β -farneseno	1444	1.03
γ -muroleno	1471	1.24
ar-curcumeno	1483	4.63
β -selineno	1487	0.60
γ -cadineno	1504	0.54
β -bisaboleno	1507	0.82
δ -cadineno	1522	1.11
Óxido de cariofileno	1570	54.20
(8 β , 13 β) Kaur-16-eno	1921	0.72
TOTAL	-	84.69

5.2. COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS

Os resultados referentes ao efeito do tratamento do óleo resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) e do ácido kaurenóico (AK) sobre as lesões intestinais induzidas por ácido acético em ratos podem ser vistos na TABELA 3 e FIGURAS 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Na **TABELA 3** o grupo controle não tratado apresentou um escore 0 e peso úmido de $68,87 \pm 3,88$. Uma única administração de 2mL de ácido acético 4% revelou um escore de lesão no controle veículo do ORCL de $8,80 \pm 0,37$ e peso úmido de $174,44 \pm 18,79$ e no controle veículo do AK um escore de lesão de $8,67 \pm 0,33$ e peso úmido de $166,76 \pm 12,63$ este aumento foi significativo quando comparado ao controle não tratado ($p < 0,001$).

O pré-tratamento 24 e 2h antes do ácido acético com ORCL 200 e 400mg/Kg via oral foi capaz de reduzir o escore da lesão ($5,80 \pm 0,49$ e $5,40 \pm 0,24$, respectivamente) e de forma significativa reduzir o peso úmido ($108,72 \pm 14,67$ e $125,72 \pm 4,48$, respectivamente, $p < 0,05$).

O pré-tratamento 24 e 2h antes do ácido acético com ORCL 200 e 400mg/Kg via retal foi capaz de reduzir de forma significativa o escore da lesão ($3,60 \pm 0,24$, $p < 0,05$ e $2,50 \pm 0,57$, $p < 0,01$ respectivamente), chegando a um percentual de redução de 72% no ORCL 400 e também foi capaz de reduzir de forma significativa o peso úmido ($123,08 \pm 13,64$ e $127,17 \pm 7,04$, respectivamente, $p < 0,05$).

O pré-tratamento 24 e 2h antes do ácido acético com AK 50 e 100 via oral foi capaz de reduzir o escore da lesão, sendo esta redução significativa nos animais tratados com AK 100 ($5,50 \pm 0,67$ e $5,00 \pm 0,45$, $p < 0,05$, respectivamente) e também reduzir o peso úmido ($110,10 \pm 8,85$ e $113,33 \pm 12,12$, respectivamente).

O pré-tratamento 24 e 2h antes do ácido acético com AK 50 e 100 via retal foi capaz de reduzir o escore da lesão, sendo esta redução significativa nos animais tratados com AK 100 ($5,28 \pm 0,92$ e $4,17 \pm 0,75$, $p < 0,05$ respectivamente), chegando a um percentual de redução de 52% e também foi

capaz de reduzir o peso úmido, sendo o resultado significativo nos animais tratados com AK 100 ($116,87 \pm 20,17$ e $101,24 \pm 3,28$, $p < 0,01$, respectivamente).

TABELA 3 – Efeito do óleo resina da *Copaifera langsdorffii* e ácido kaurenóico na avaliação de escore e peso úmido em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos.

GRUPOS	ESCORE Avaliação Macroscópica Média $\pm$ E.P.M. ^a	PESO ÚMIDO (mg/cm) Média $\pm$ E.P.M. ^b
Controle não tratado	0	$68,87 \pm 3,88$
Controle AA (Veículo ORCL–2% de tween 80)	$8,80 \pm 0,37\#$	$174,44 \pm 18,79\#$
Controle AA (Veículo AK–3% de DMSO)	$8,67 \pm 0,33\#$	$166,76 \pm 12,63\#$
VIA ORAL		
AA + ORCL 200mg/kg	$5,80 \pm 0,49$ (34%)	$108,72 \pm 14,67^*$ (38%)
AA + ORCL 400mg/kg	$5,40 \pm 0,24$ (38%)	$125,72 \pm 4,48^*$ (28%)
AA + AK 50mg/kg	$5,50 \pm 0,67$ (36%)	$110,10 \pm 8,85$ (34%)
AA + AK 100mg/kg	$5,00 \pm 0,45^*$ (42%)	$113,33 \pm 12,12$ (32%)
VIA RETAL		
AA + ORCL 200mg/kg	$3,60 \pm 0,24^*$ (59%)	$123,08 \pm 13,64^*$ (29%)
AA + ORCL 400mg/kg	$2,50 \pm 0,57^{**}$ (72%)	$127,17 \pm 7,04^*$ (27%)
AA + AK 50mg/kg	$5,28 \pm 0,92$ (39%)	$116,87 \pm 20,17$ (30%)
AA + AK 100mg/kg	$4,17 \pm 0,75^*$ (52%)	$101,24 \pm 3,28^{**}$ (39%)

AA=ácido acético, ORCL=óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e AK=ácido kaurenóico.

Os valores entre parênteses representam o percentual de redução.

Controle AA vs Controle não tratado $p < 0,001$.

^aMann-Whitney's U-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs controle AA.

^bStudent Newman-Keul's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs controle AA.

Na **FIGURA 7** observa-se que 24h após a administração de 2mL ácido acético 4%, via retal, o pré-tratamento via oral e retal de ORCL 200 e 400, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a atividade da enzima mieloperoxidase. Uma marcada diminuição na **FIGURA 8** foi notada 24h após a administração de 2mL ácido acético 4%, via retal, o pré-tratamento via oral e retal do AK 50 e 100, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a atividade da enzima mieloperoxidase.

Na **FIGURA 9** também ocorreram significativas mudanças na dosagem de malonaldeído, observa-se que 24h após a administração de 2mL ácido acético 4%, via retal, o pré-tratamento via oral e retal de ORCL 200 e 400, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a dosagem de malonaldeído. Na **FIGURA 10** o pré-tratamento via oral e retal de AK 50 e 100, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a dosagem de malonaldeído.

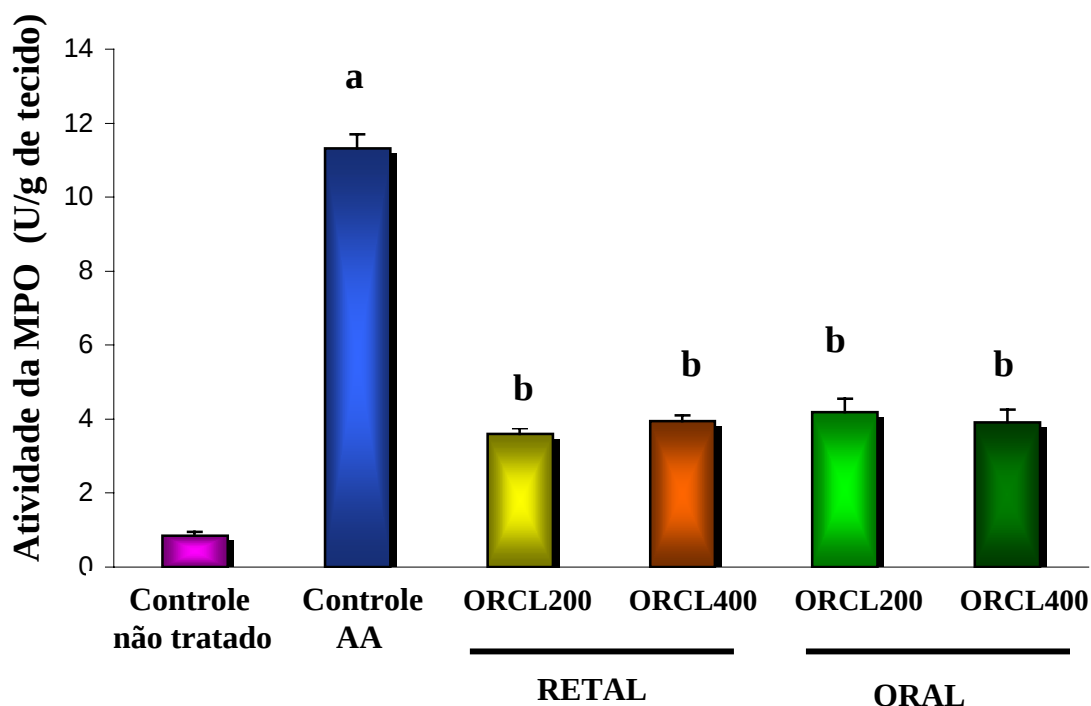
A **FIGURA 11** mostra que 24h após a administração de 2mL ácido acético 4%, via retal, o pré-tratamento via retal de ORCL 200 e 400, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a concentração de nitrito.

Na **FIGURA 12** observa-se que 24h após a administração de 2mL ácido acético 4%, via retal, o pré-tratamento via retal de ORCL 200, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p<0.001$) a concentração de catalase no cólon.

A **FIGURA 13** mostra o resultado da investigação histopatológica do intestino, tratados com veículo e ORCL 200, onde é observada uma atenuação das desordens associadas ao grupo sem tratamento, como também na **FIGURA 14**, onde AK 100 foi capaz de atenuar os danos causados pelo ácido acético.

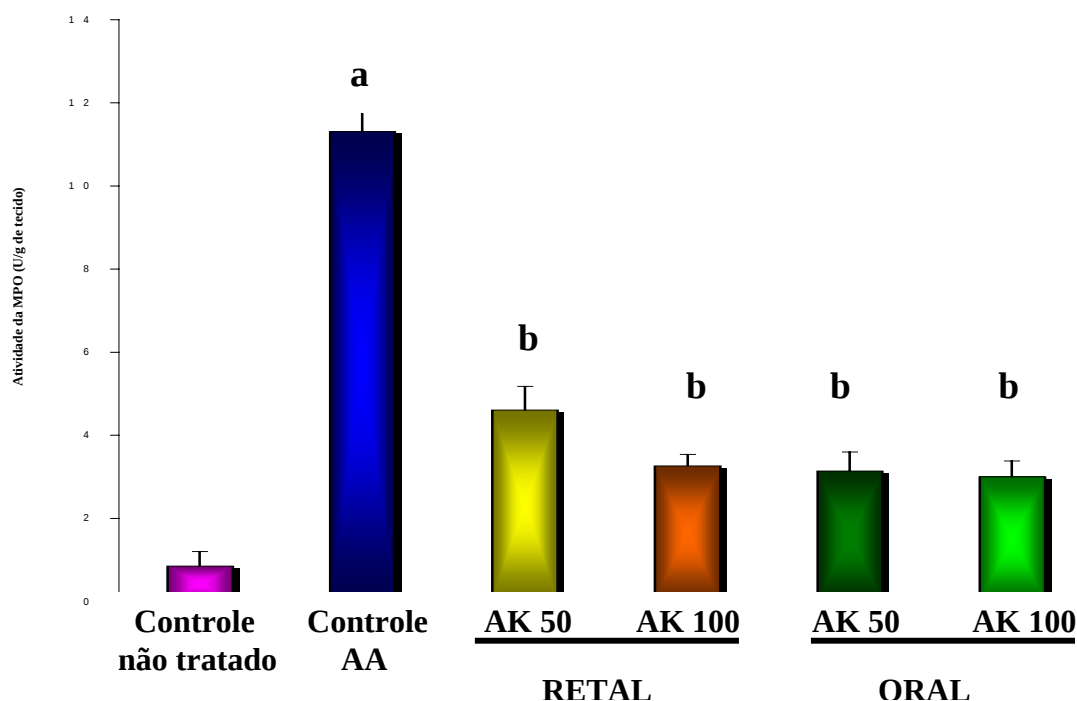
A **FIGURA 15** mostra a lesão macroscópica causada no cólon no modelo de colite induzida por ácido acético.

FIG 7. Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.



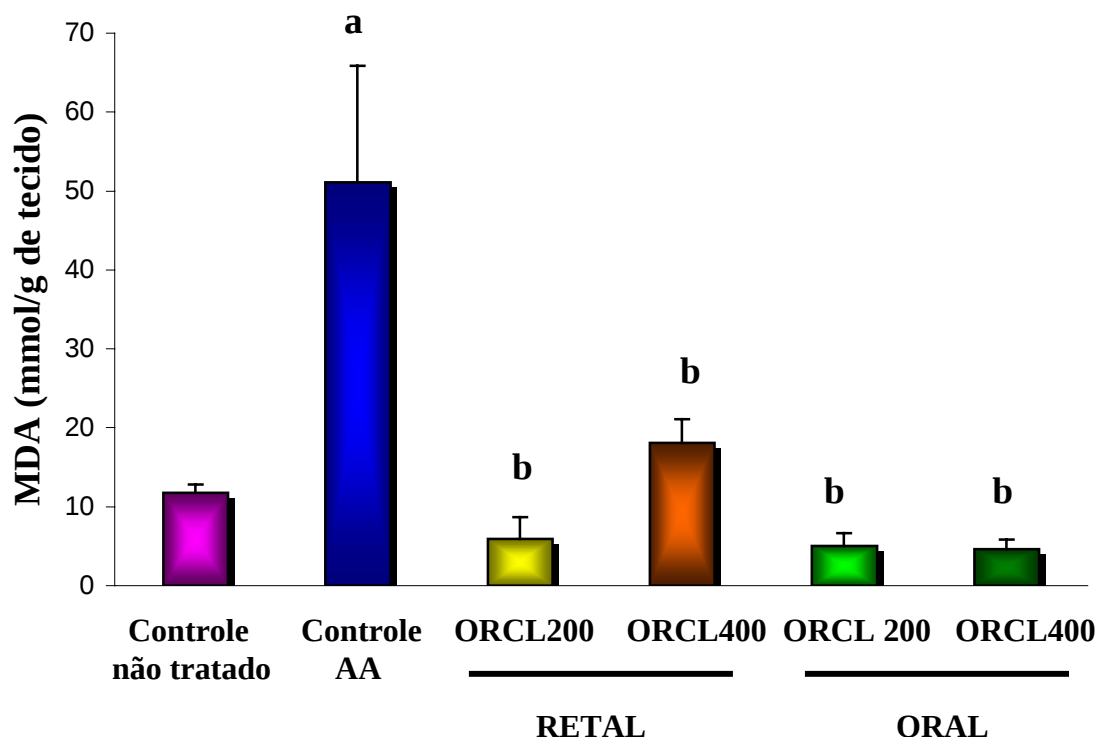
Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético em ratos. A atividade da mieloperoxidase no cólon (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal ou oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle AA.

FIG 8. Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico sobre a atividade da mieloperoxidase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.



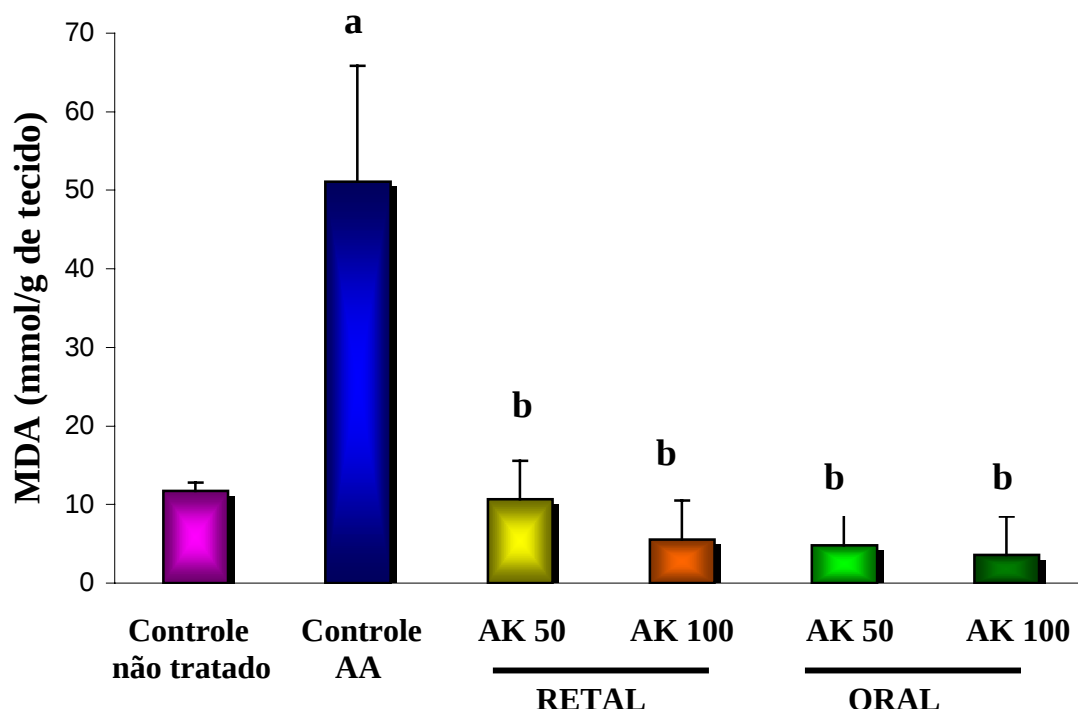
Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico (50 e 100 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético em ratos. A atividade da mieloperoxidase no cólon (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de DMSO 3% retal ou oral), Ácido Kaurenóico 50 mg/kg (AK 50) e 100 mg/kg (AK 100). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle AA.

FIG 9. Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.



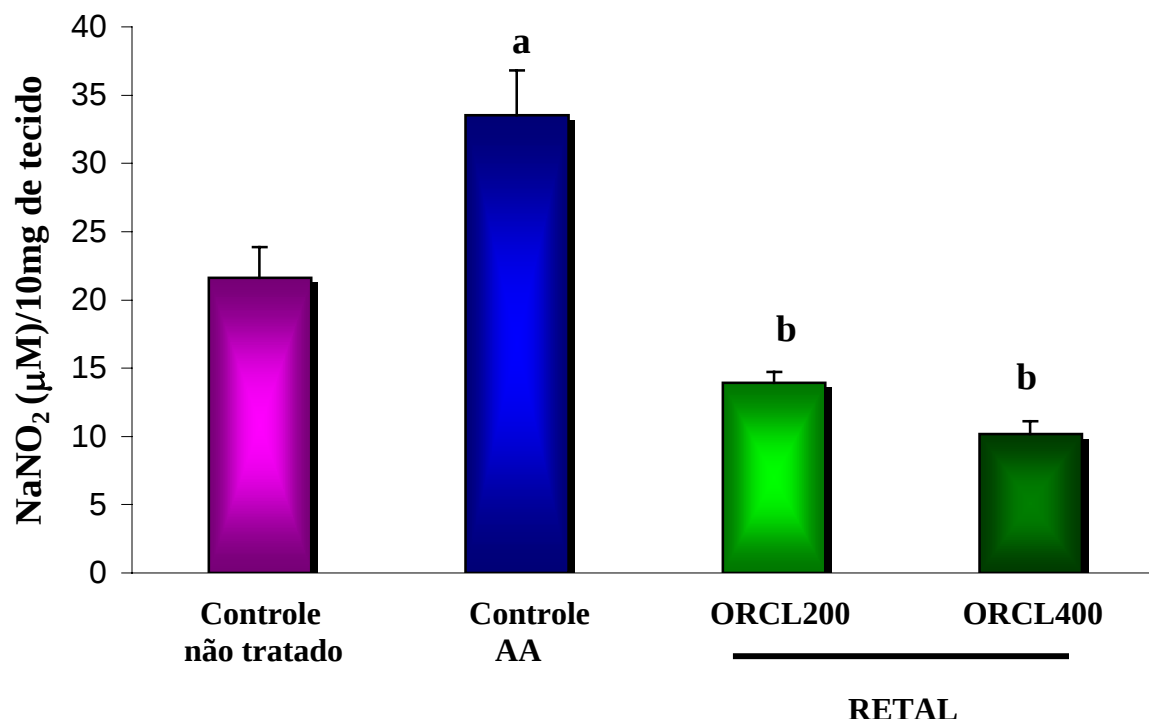
Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre os níveis de malonaldeído no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético em ratos. Os níveis de malonaldeído no cólon (mmol/g de tecido) foram quantificados na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal ou oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.01 vs controle AA.

FIG 10. Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico sobre a dosagem do malonaldeído, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.



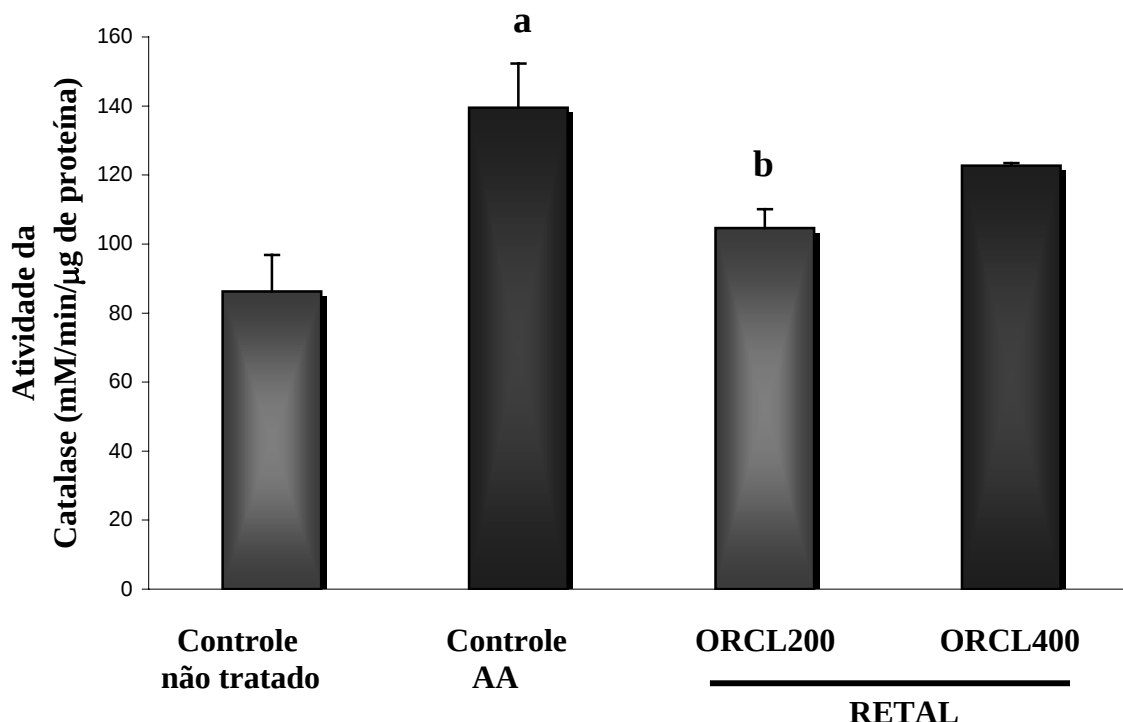
Efeito da administração retal e oral do Ácido Kaurenóico (50 e 100 mg/kg) sobre os níveis de malonaldeído no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético em ratos. Os níveis de malonaldeído no cólon (mmol/g de tecido) foram quantificados na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de DMSO 3% retal ou oral), Ácido Kaurenóico 50 mg/kg (AK 50) e 100 mg/kg (AK 100). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.01 vs controle AA.

FIG 11. Efeito da administração retal do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.



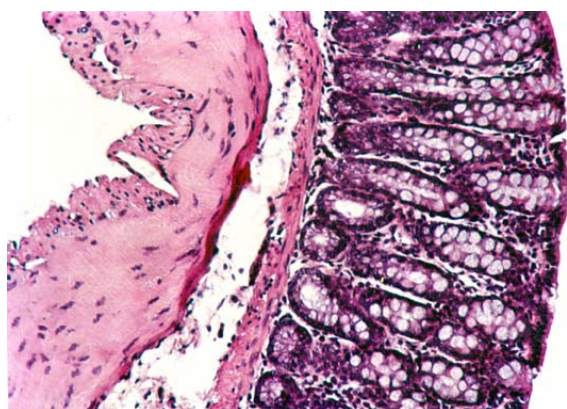
Efeito da administração retal do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético em ratos. A concentração de nitrito no cólon ($\mu\text{M}/10\text{mg}$ de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^a $p < 0.001$ vs controle não tratado; ^b $p < 0.001$ vs controle AA.

FIG 12. Efeito da administração retal do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 24 horas após a indução da colite com ácido acético em ratos.

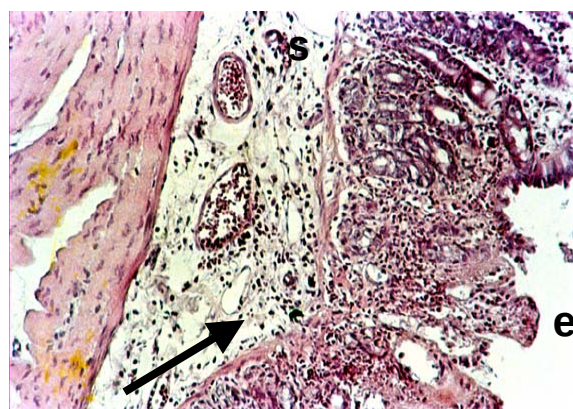


Efeito da administração retal do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de catalase no cólon, 24 horas após a administração de ácido acético (AA) em ratos. A concentração de catalase no cólon (mM/min/μg de proteína) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle AA; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA ± EPM de 6 ratos. ^aP < 0.001 vs controle não tratado; ^bP < 0.001 vs controle AA.

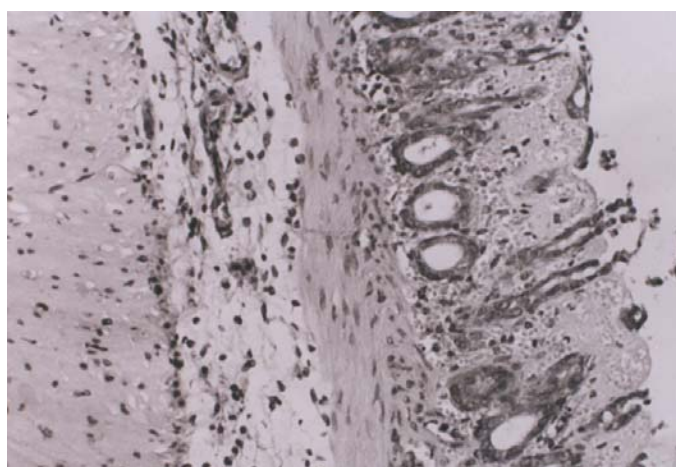
FIG 13. Efeito do óleo-resina da Copaíba na colite induzida por ácido acético.



CONTROLE VEÍCULO



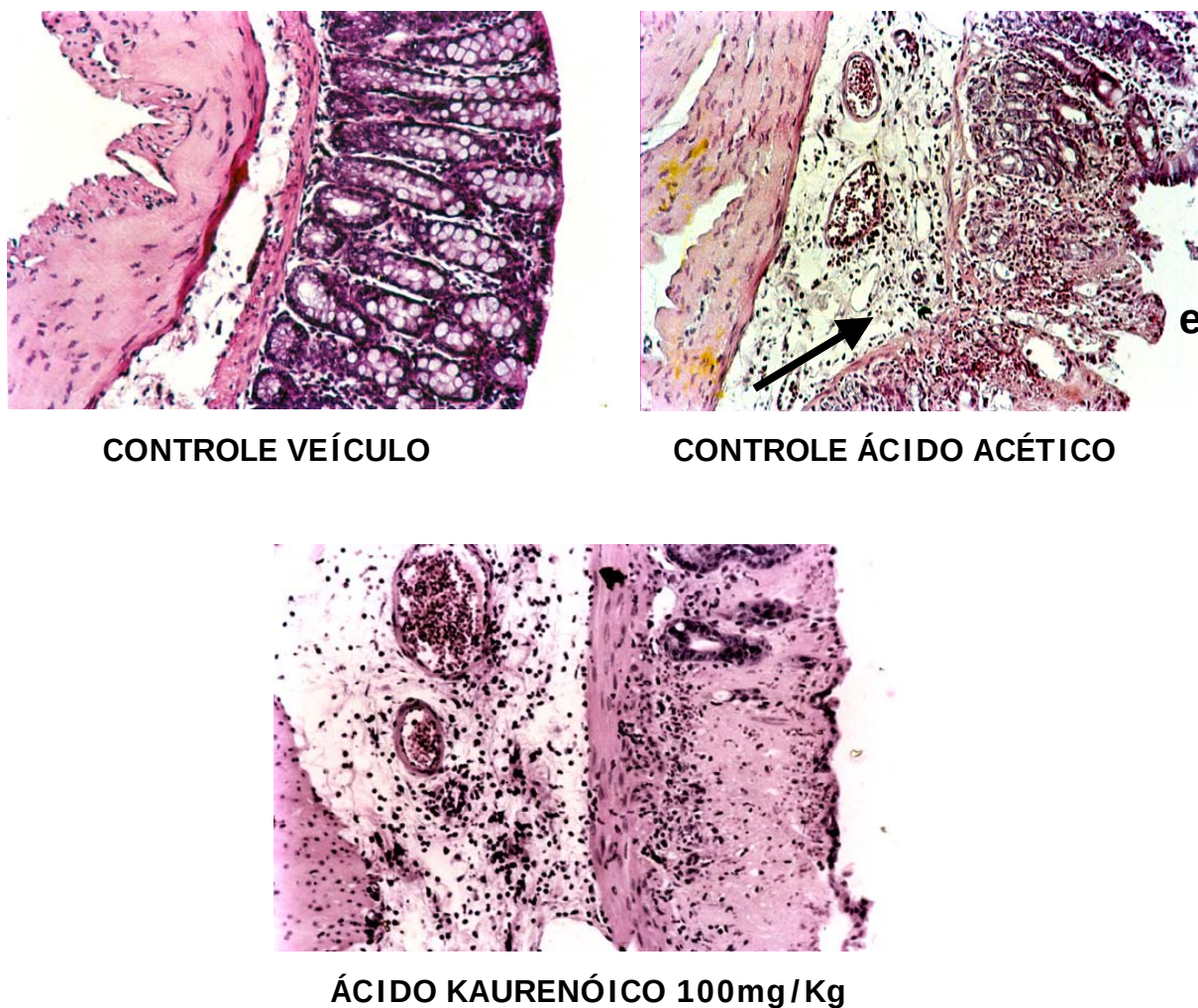
CONTROLE ÁCIDO ACÉTICO



ORCL 200mg/Kg

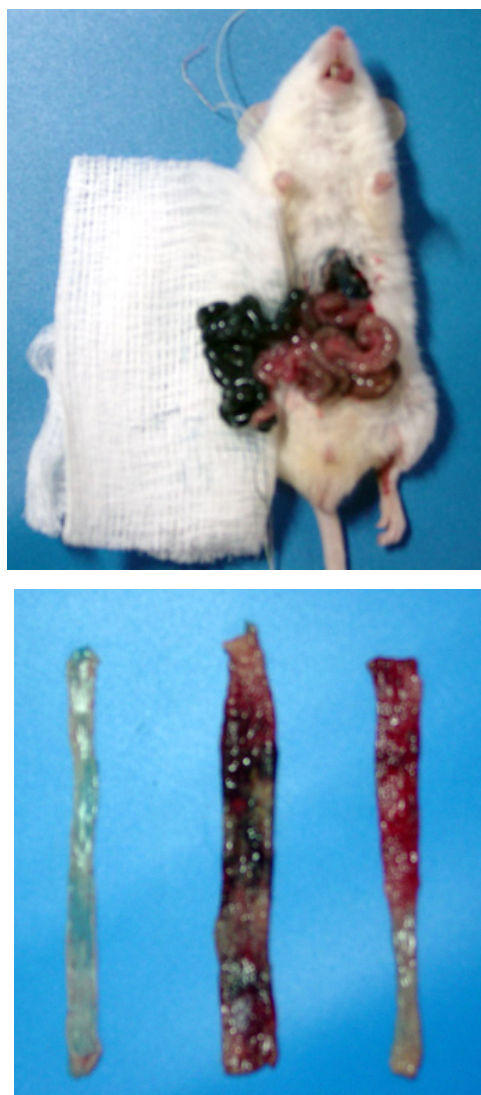
Efeito do óleo-resina da Copaíba na colite induzida por ácido acético em ratos. Quando comparado ao controle veículo, a análise histológica do cólon dos ratos tratados com ácido acético mostra uma desorganização do epitélio (e), edema na submucosa (s) com uma inflamação difusa, infiltração de leucócitos e foco de necrose (flecha). Secção do cólon tratado, via retal, com óleo-resina da Copaíba (200 mg/kg) mostra uma atenuação da desordem morfológica e redução da infiltração de células inflamatórias e edema associada à administração do ácido acético (H & E X 40).

FIG 14. Efeito do Ácido Kaurenóico na colite induzida por ácido acético.



Efeito do Ácido Kaurenóico na colite induzida por ácido acético em ratos. Quando comparado ao controle veículo, a análise histológica do cólon dos ratos tratados com ácido acético mostra uma desorganização do epitélio (e), edema na submucosa (s) com uma inflamação difusa, infiltração de leucócitos e foco de necrose (flecha). Secção do cólon tratado, via retal, com Ácido Kaurenóico (100 mg/kg) mostra uma atenuação da desordem morfológica e redução da infiltração de células inflamatórias e edema associada à administração do ácido acético (H & E X 40)

FIG 15. Foto mostrando a lesão causada no cólon no modelo de colite induzida por ácido acético.



CONT. VEÍCULO – CONT ÁC. ACÉTICO – ORCL 200mg/Kg

5.3. COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR TNB (ÁCIDO TRINITROBENZENO SULFÔNICO) EM RATOS

Os resultados da avaliação do efeito do tratamento do óleo resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) sobre as lesões intestinais induzidas por TNB em ratos podem ser vistos na TABELA 4 e FIGURAS 16, 17, 18 e 19.

Na **TABELA 4** o grupo controle não tratado apresentou um escore 0 e peso úmido de $171,16 \pm 4,24$. Uma única administração intracolônica de 0,25 mL de etanol 50% contendo 20 mg de TNB revelou um escore de lesão no controle veículo do ORCL de $9,00 \pm 0,84$ e peso úmido de $284,37 \pm 16,70$ este aumento foi significativo quando comparado ao controle não tratado ($p < 0,001$).

O Tratamento por via oral (ORCL 400) e retal (ORCL 400), 2, 24 e 48h após a indução da colite com TNB foi capaz de reduzir o escore da lesão ($1,83 \pm 0,83$ e $3,40 \pm 1,22$, respectivamente, $p < 0,001$ e $p < 0,01$) e também de forma significativa reduzir o peso úmido quando tratado via oral com ORCL 400 ($157,40 \pm 4,58$, $p < 0,01$).

Na **FIGURA 16** observa-se que 72h após a indução da colite com TNB via retal, o tratamento via oral e retal de ORCL 400, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) a atividade da enzima mieloperoxidase.

A **FIGURA 17** mostra o resultado do tratamento via oral de ORCL 400, 72h após a indução da colite com TNB via retal, demonstrando que o ORCL 400 não foi capaz de alterar de forma significativa a concentração do malonaldeído. Também na **FIGURA 18** observa-se que 72h após a indução da colite com TNB via retal, o tratamento via oral de ORCL 400, não foi capaz de alterar de forma significativa a concentração de catalase no cólon.

Os intestinos dos animais foram avaliados através de um estudo histopatológico que pode ser observado na **FIGURA 19**, onde o tratamento com ORCL 400 eliminou, parcialmente, os danos causados pelo TNB.

TABELA 4 – Efeito do óleo resina da *Copaifera langsdorffii* na avaliação de escore e peso úmido em modelo de colite ulcerativa induzida por TNB em ratos.

GRUPOS	ESCORE Média ± E.P.M. ^a	PESO ÚMIDO (mg/cm) Média ± E.P.M. ^b
Controle não tratado	0	171,16 ± 4,24
Controle TNB (Veículo ORCL – 2% de tween 80)	9,00 ± 0,84*	284,37 ± 16,70*
VIA ORAL		
TNB + ORCL400mg/kg	1,83 ± 0,83***(80%)	157,40 ± 4,58** (45%)
VIA RETAL		
TNB + ORCL400mg/kg	3,40 ± 1,22** (62%)	210,88 ± 24,45 (26%)

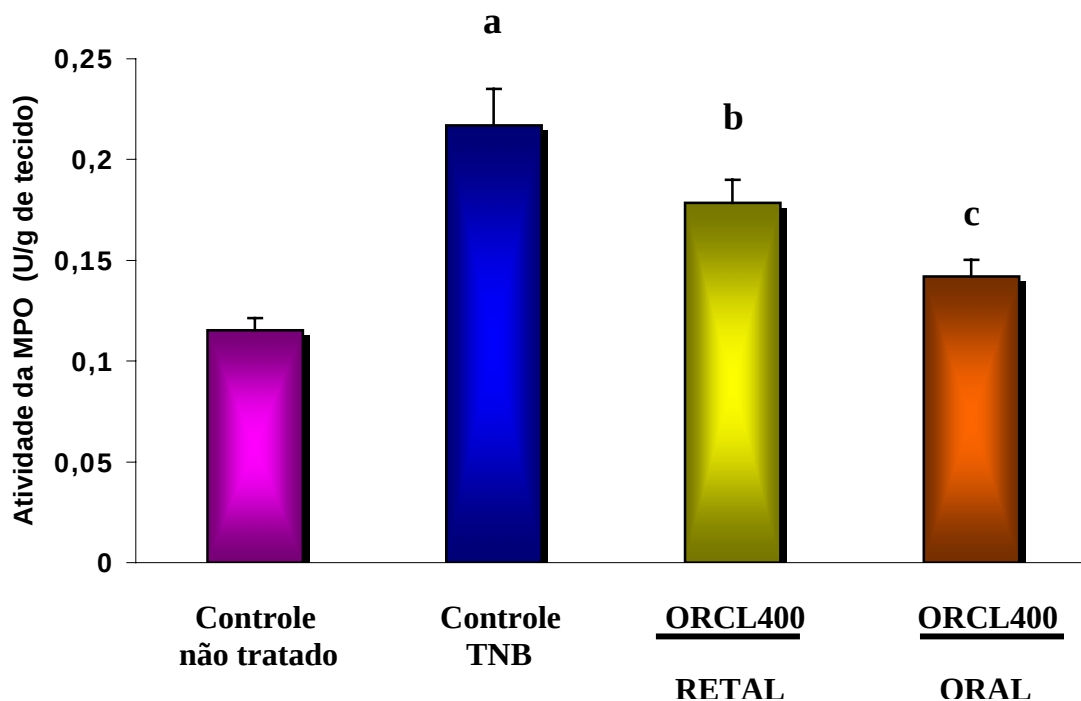
TNB=ácido trinitrobenzeno sulfônico, ORCL=óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*.

Os valores entre parênteses representam o percentual de redução.

^aMann-Whitney's U-test, ** p < 0.01, *** p < 0.001, vs controle TNB.

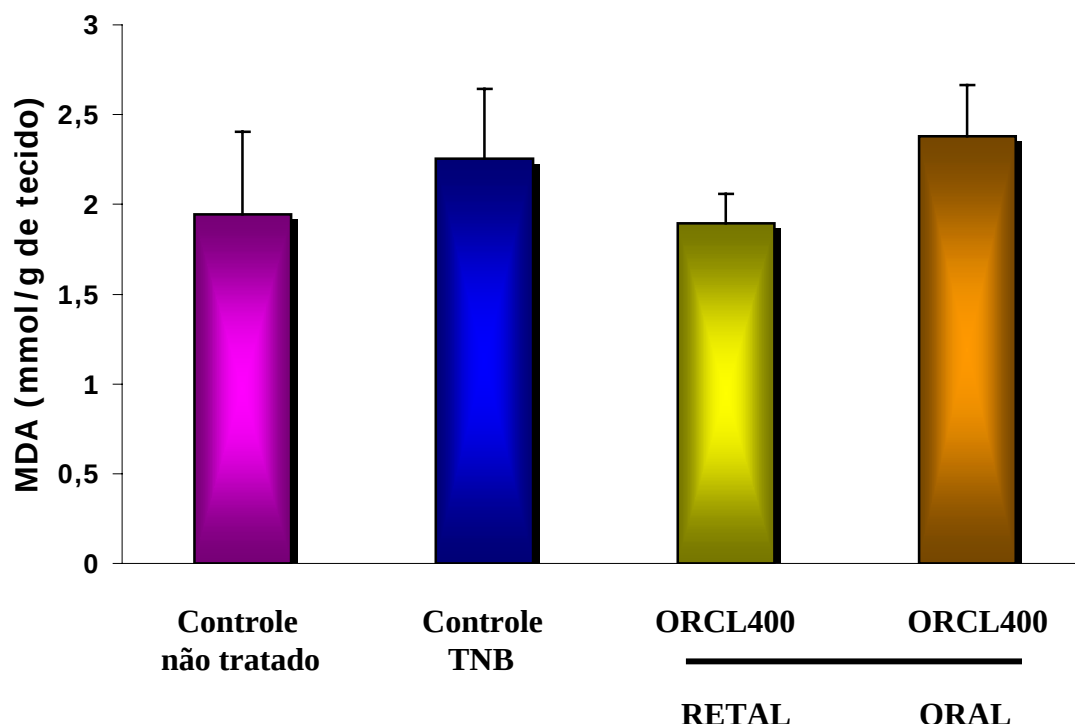
^bStudent Newman-Keul's test, * p < 0.05, ** p < 0.01, vs controle TNB.

FIG 16. Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos.



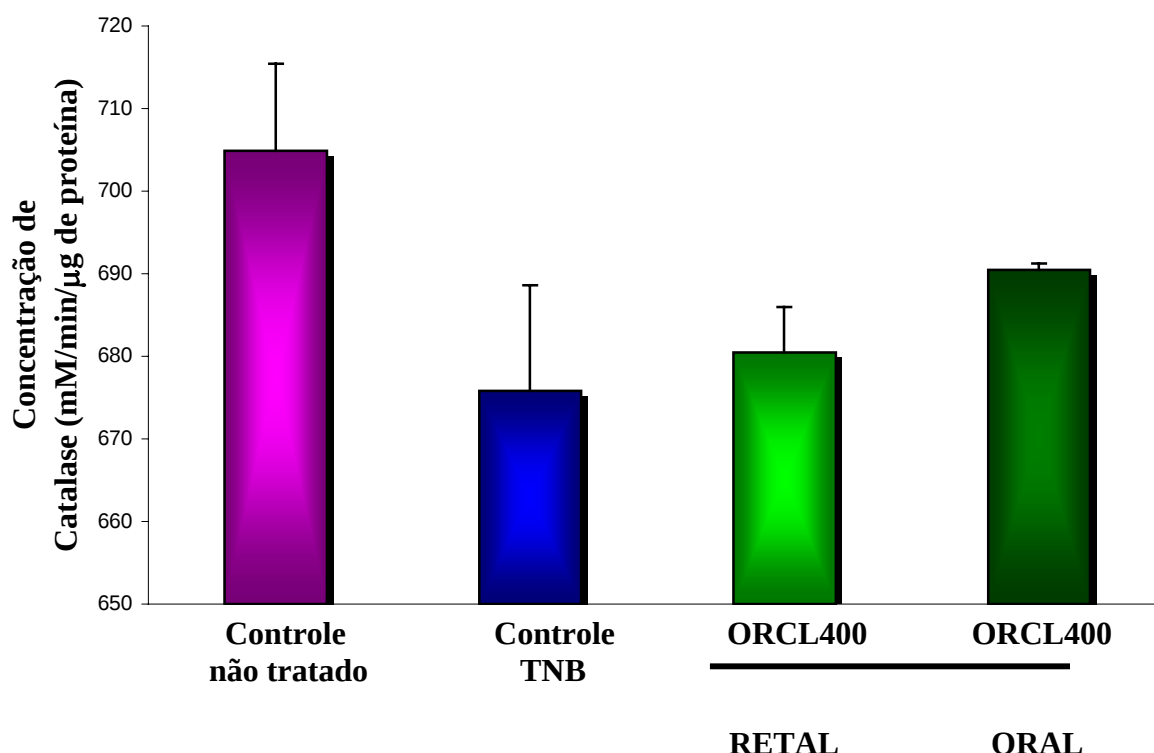
Efeito da administração retal e oral do óleo-resina da Copaíba (400 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase no cólon, 72 horas após a administração de TNB em ratos. A atividade da mieloperoxidase no cólon (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle TNB; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal), óleo-resina da Copaíba 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.05 vs controle TNB; ^cp < 0.001 vs controle TNB.

FIG 17. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos.



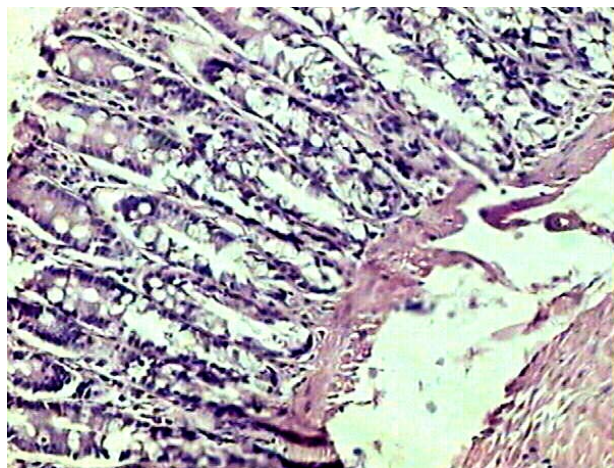
Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (400 mg/kg) sobre os níveis de malonaldeído no cólon, 72 horas após a administração de TNB em ratos. Os níveis de malonaldeído no cólon (mmol/g de tecido) foram quantificados na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle TNB; 0.5 mL de 2% Tween 80 retal), óleo-resina da Copaíba 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. Dados não significativos.

FIG 18. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos.

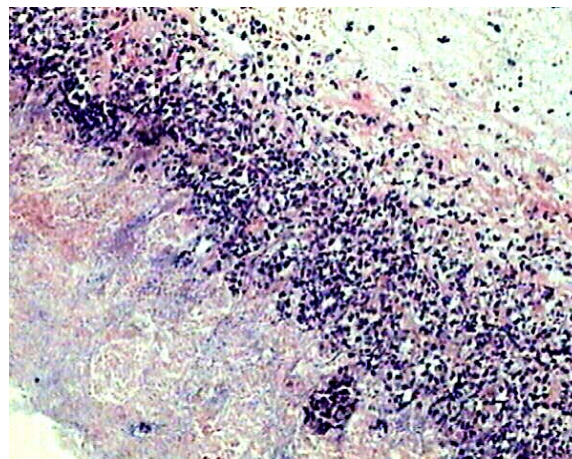


Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de catalase no cólon, 72 horas após a administração de TNB em ratos. A concentração de catalase no cólon (mM/min/μg de proteína) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle TNB; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA ± EPM de 6 ratos. Dados não significativos.

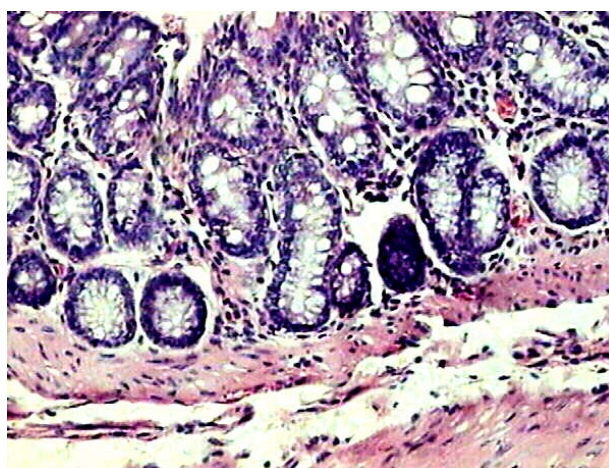
FIG 19. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba 2, 24 e 48 horas após a indução da colite com TNB em ratos.



CONTROLE VEÍCULO



CONTROLE TNB



ORCL 400mg/Kg

Efeito do óleo-resina da Copaíba na colite induzida por TNB em ratos. Quando comparado ao controle veículo, a análise histológica do cólon dos ratos tratados com TNB mostra uma desorganização do epitélio, edema na submucosa com uma inflamação difusa, infiltração de leucócitos. Secção do cólon tratado, via oral, com óleo-resina da Copaíba (400 mg/kg) mostra uma atenuação da desordem morfológica e redução da infiltração de células inflamatórias e edema associada à administração do TNB (Ácido Tinitrobenzóico) (H & E X 40).

5.4. INJURIA INTESTINAL INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM RATOS.

O efeito do tratamento óleo resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão sobre as injúrias intestinal em ratos podem ser vistos nas FIGURAS 20, 21, 22, 23, 24 e 25.

O pré-tratamento via oral de ORCL 400, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade da enzima mieloperoxidase no modelo de isquemia-reperfusão (**FIGURA 20**).

Na **FIGURA 21** observa-se que o pré-tratamento via oral de ORCL 200 e 400, foi capaz de diminuir de forma significativa ($p < 0,001$) a concentração do malonaldeído no modelo de isquemia-reperfusão.

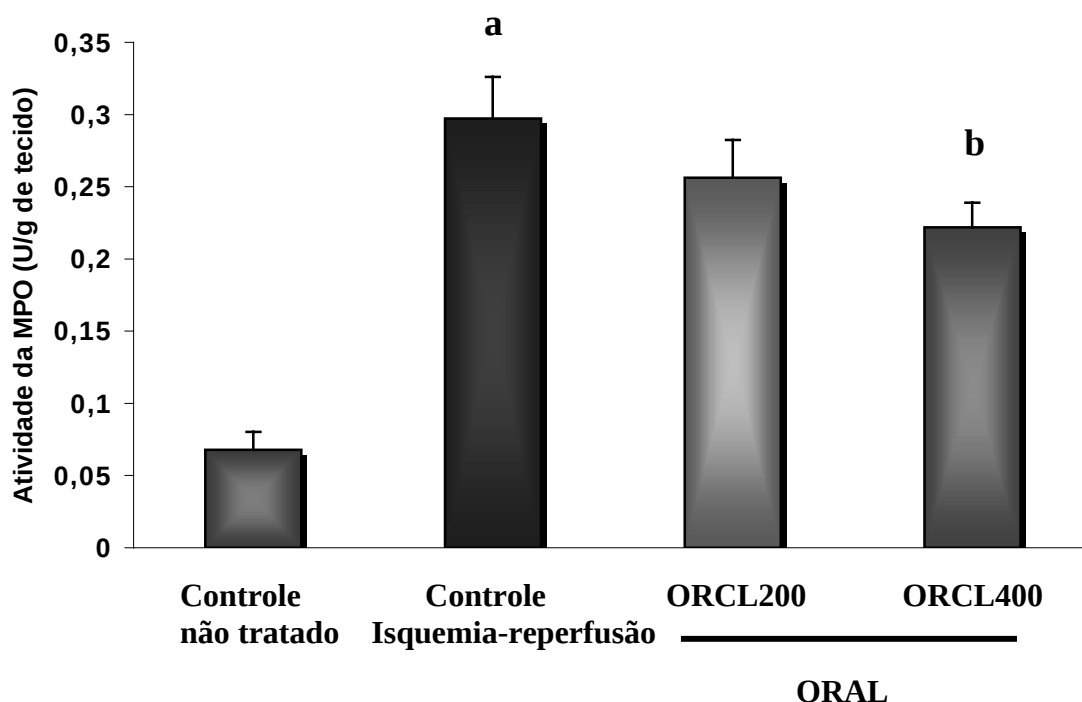
O efeito do pré-tratamento via oral de ORCL 200 e 400, pode ser observado na **FIGURA 22**, onde foi capaz de diminuir de forma significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) a concentração de nitrito no tecido.

Na **FIGURA 23** observa-se que mesmo com a indução da isquemia-reperfusão, o pré-tratamento via oral de ORCL 200 e 400, foi capaz de diminuir de forma significativa ($p < 0,001$) a concentração de catalase no intestino.

Na **FIGURA 24** observa-se que após a indução da isquemia-reperfusão, o pré-tratamento via oral de ORCL 200 e 400 foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,001$) a concentração de grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP) no intestino.

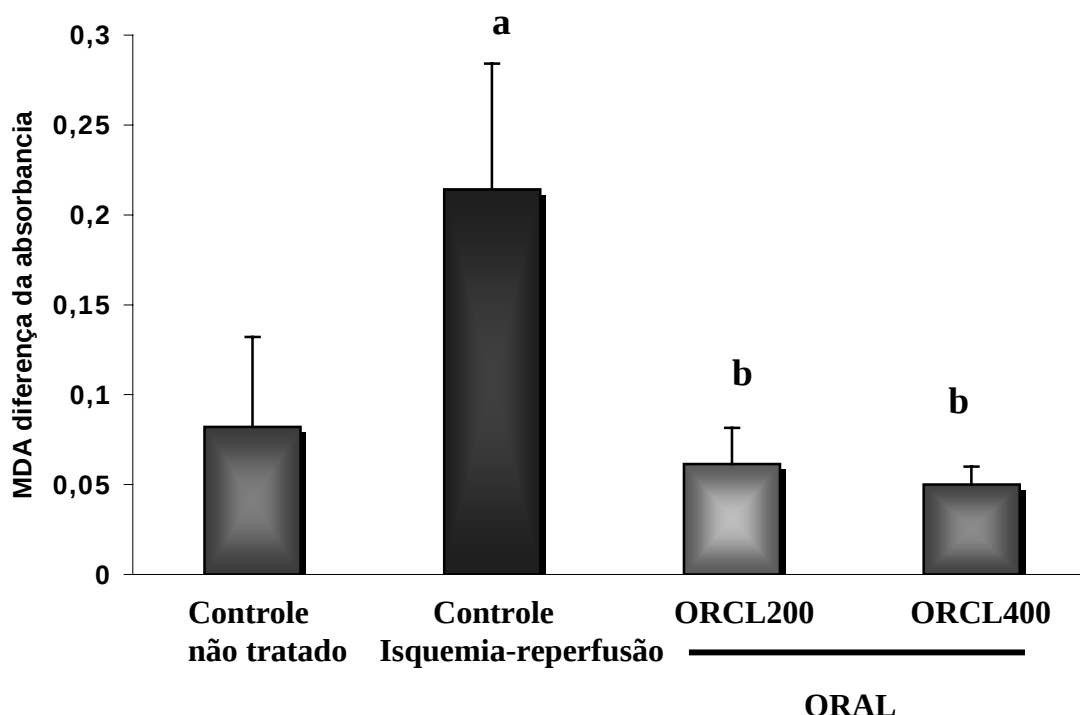
Os intestinos dos animais foram avaliados através de um estudo histopatológico que pode ser observado na **FIGURA 25**, onde o tratamento com ORCL 200, parcialmente, as injúrias causadas no modelo de isquemia-reperfusão.

FIG 20. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos.



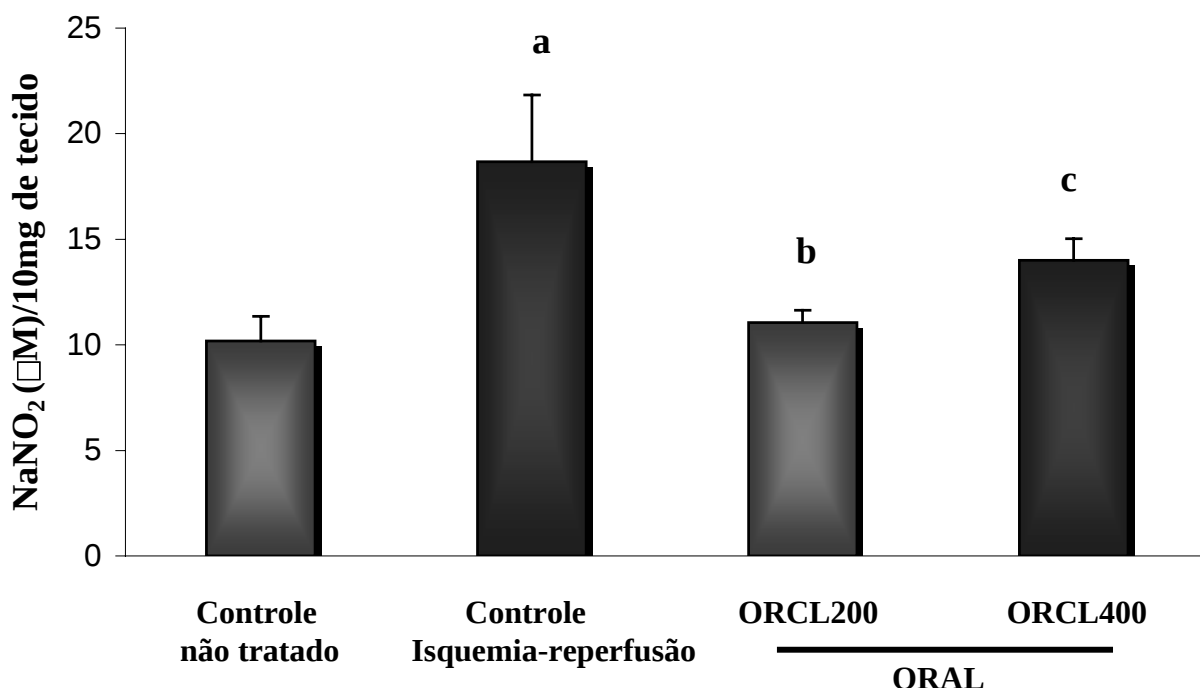
Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase, após 45min de isquemia e uma hora de reperfusão em intestino de ratos. A atividade da mieloperoxidase no intestino (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle isquemia-reperfusão; 0.5 mL de 2% Tween 80 via oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.05 vs controle isquemia-reperfusão.

FIG 21. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de malonaldeído, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos.



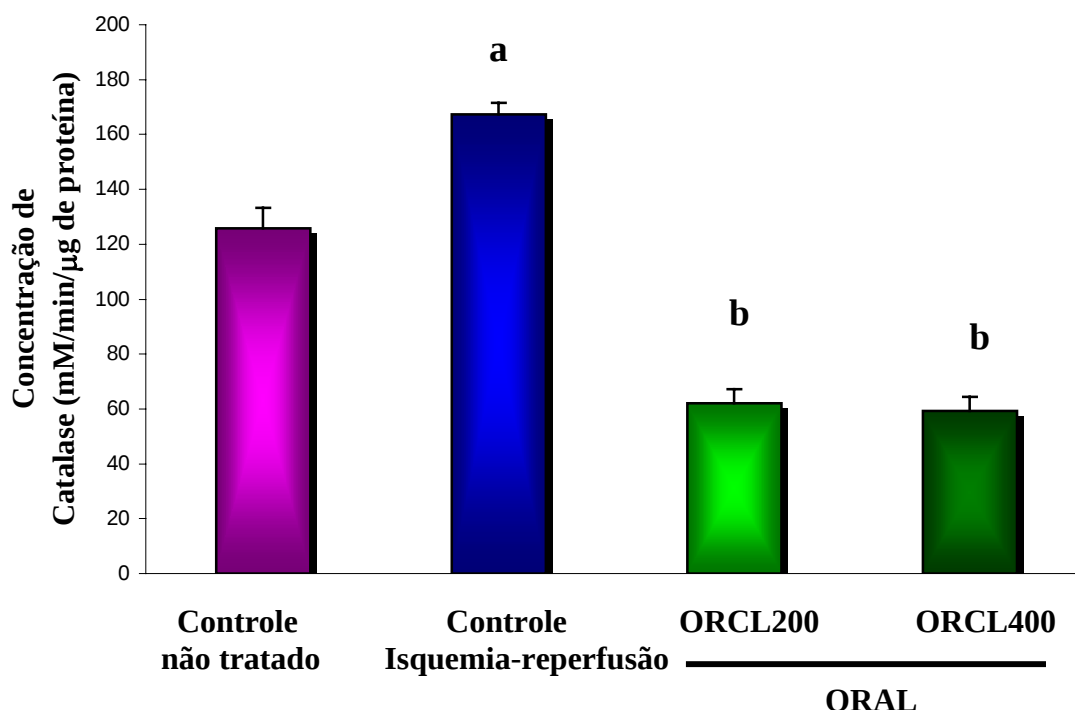
Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre os níveis de malonaldeído, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos. Os níveis de malonaldeído no intestino (mmol/g de tecido) foram quantificados na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle isquemia-reperfusão; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA ± EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle isquemia-reperfusão.

FIG 22. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos.



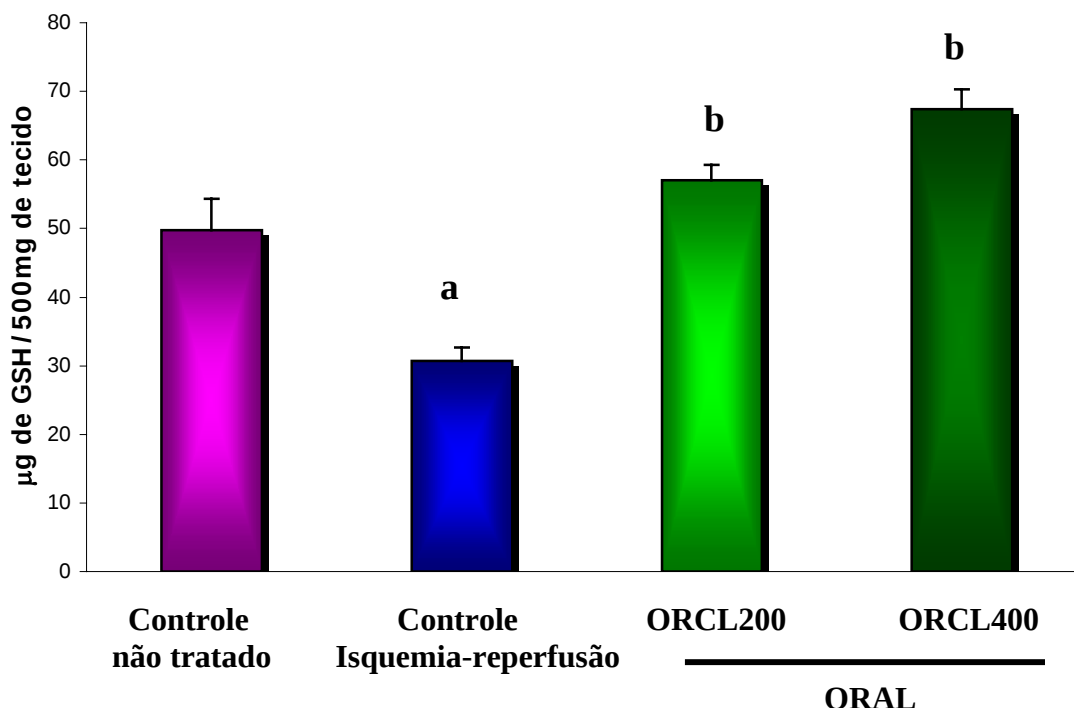
Efeito da administração retal do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos. A concentração de nitrito no intestino ($\mu\text{M}/10\text{mg}$ de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle isquemia-reperfusão; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.01 vs controle isquemia-reperfusão; ^cp < 0.05 vs controle isquemia-reperfusão.

FIG 23. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem de catalase, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos.



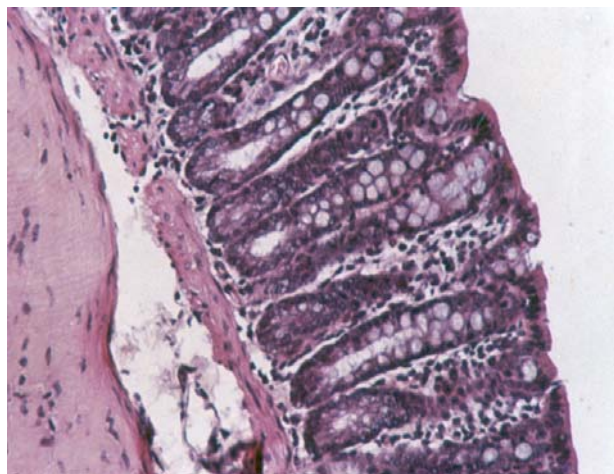
Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de catalase, 24, 12 e 2 horas antes da indução da isquemia-reperfusão em intestino de ratos. A concentração de catalase no intestino (mM/min/μg de proteína) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle isquemia-reperfusão; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA ± EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle isquemia-reperfusão.

FIG 24. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a diminuição de grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP) na isquemia-reperfusão em intestino de ratos.

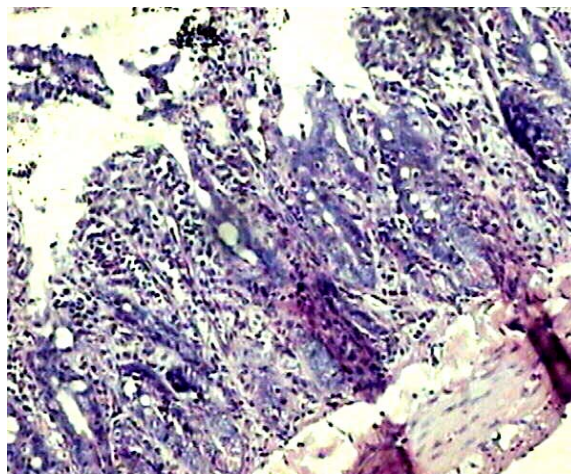


Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a diminuição de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) na isquemia-reperfusão em intestino de ratos. A concentração de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) no intestino (µg de GSH/500mg de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle isquemia-reperfusão; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle isquemia-reperfusão.

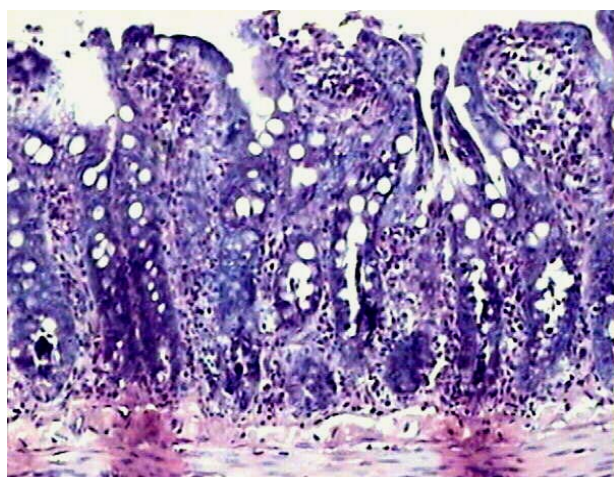
FIG 25. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a isquemia-reperfusão em intestino de ratos.



CONTROLE VEÍCULO



CONT. ISQUEMIA-REPERFUSÃO



ORCL 400

Efeito do óleo-resina da copaíba no modelo de isquemia-reperfusão em ratos. Quando comparado ao controle veículo, a análise histológica do cólon dos ratos submetidos a 45min de isquemia e uma hora de reperfusão mostra uma congestão com exsudato inflamatório e perda da integridade epitelial. Secção do cólon tratado, via oral, com óleo-resina da Copaíba (ORCL 200mg/kg) mostram população caliciforme preservada, moderado exsudato inflamatório e discreta destruição epitelial (H & E X 40).

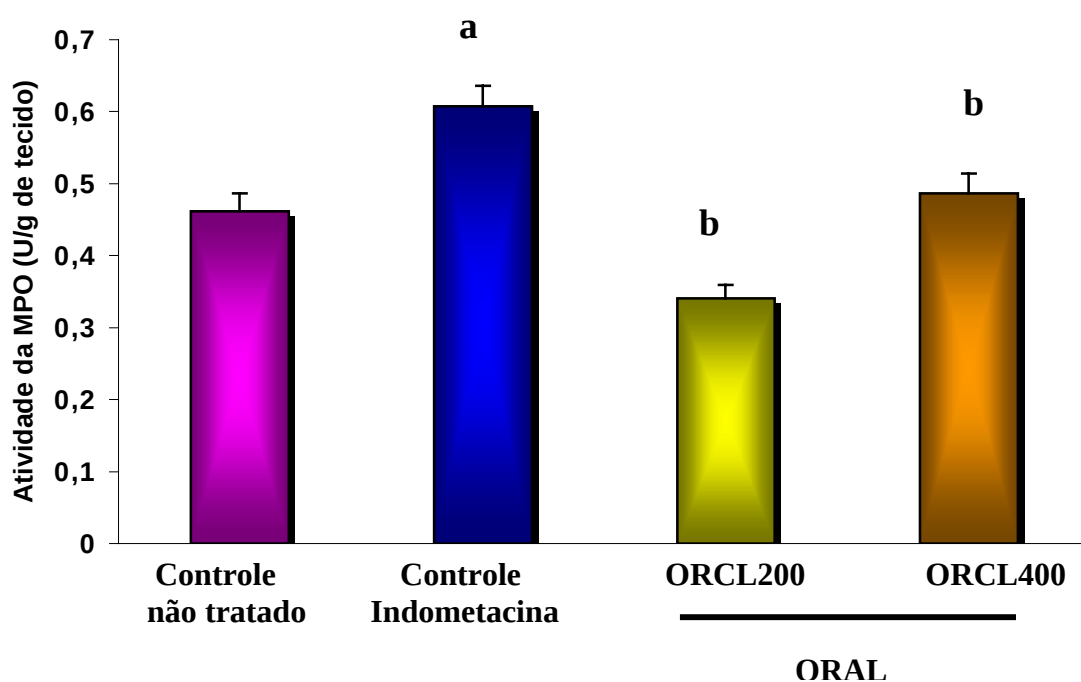
5.5. TOXICIDADE INTESTINAL INDUZIDA POR INDOMETACINA EM RATOS.

O efeito do tratamento óleo resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) e Ácido Kaurenóico (AK) 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina podem ser vistos nas FIGURAS 26, 27, 28 e 29.

O pré-tratamento via oral de ORCL 200, 400 e AK 100, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,001$) a atividade da enzima mieloperoxidase no modelo de toxicidade intestinal com indometacina (**FIGURA 26 e 27**).

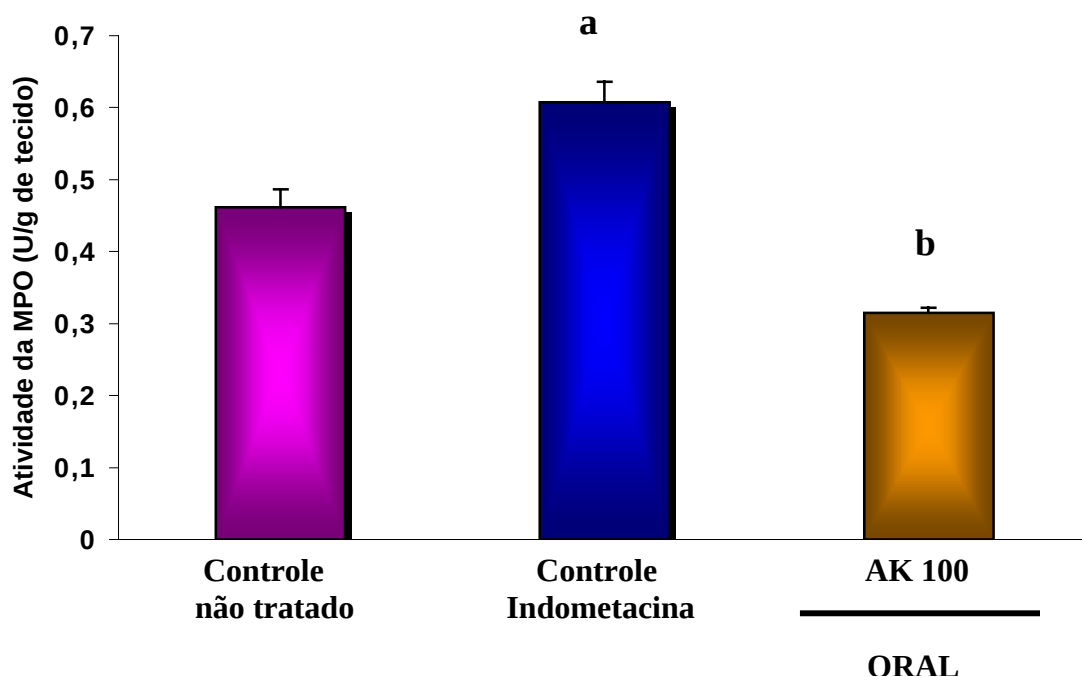
O efeito do pré-tratamento via oral de ORCL 200, 400 e AK 100, pode ser observado na **FIGURA 28 e 29**, onde foram capaz de diminuir de forma significativa ($p < 0,001$) a concentração de nitrito no tecido.

FIG 26. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos.



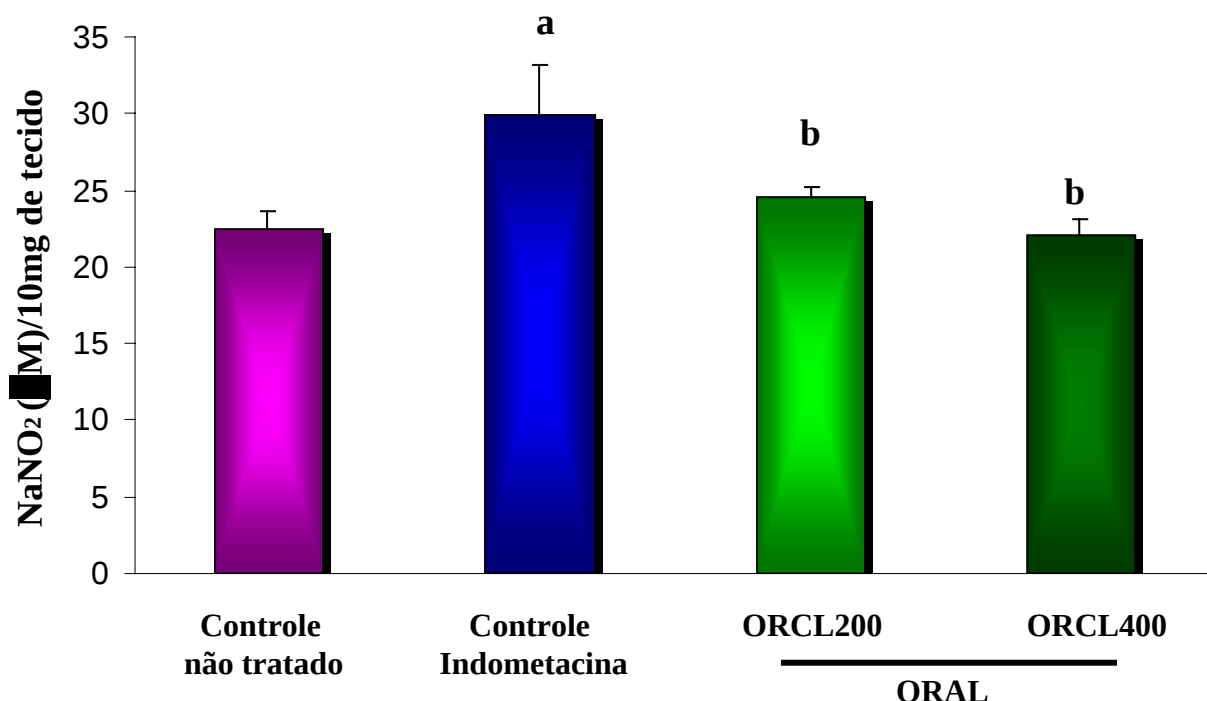
Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos. A atividade da mieloperoxidase no intestino (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle indometacina; 0.5 mL de 2% Tween 80 via oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle indometacina.

FIG 27. Efeito da administração oral do ácido kaurenóico sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos.



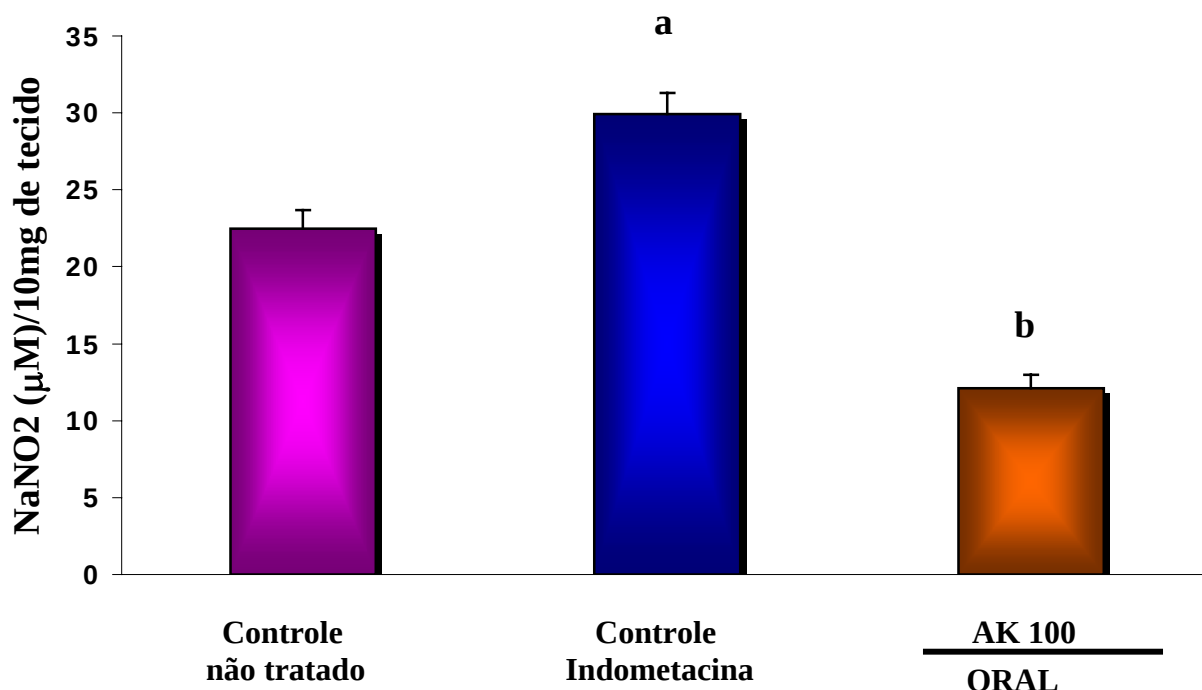
Efeito da administração oral do ácido kaurenóico (100 mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em ratos. A atividade da mieloperoxidase no intestino (U/g de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle indometacina; 0.5 mL de 2% Tween 80 via oral), ácido kaurenóico 100mg/kg (AK 100). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^ap < 0.001 vs controle não tratado; ^bp < 0.001 vs controle indometacina.

FIG 28. Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba sobre a dosagem do nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestino de ratos.



Efeito da administração oral do óleo-resina da Copaíba (200 e 400 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestino de ratos. A concentração de nitrito no intestino ($\mu\text{M}/10\text{mg}$ de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle indometacina; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), óleo-resina da Copaíba 200 mg/kg (ORCL 200) e 400 mg/kg (ORCL 400). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^a $p < 0.001$ vs controle não tratado; ^b $p < 0.001$ vs controle indometacina.

FIG 29. Efeito da administração oral do Ácido Kaurenóico sobre a dosagem do nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestino de ratos.



Efeito da administração oral do ácido kaurenóico (100 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito, 12 e 2 horas antes da indução da toxicidade intestinal com indometacina em intestino de ratos. A concentração de nitrito no intestino ($\mu\text{M}/10\text{mg}$ de tecido) foi quantificada na ausência de tratamento (controle não tratado), através do pré-tratamento com veículo (Controle indometacina; 0.5 mL de 2% Tween 80 oral), ácido kaurenóico 100mg/kg (AK 100). Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. ^a $p < 0.001$ vs controle não tratado; ^b $p < 0.001$ vs controle indometacina.

5.6. PERMEABILIDADE INTESTINAL COM AZUL DE EVANS EM CAMUNDONGOS.

O efeito do pré-tratamento óleo resina da *Copaífera langsdorffii* (ORCL) e Ácido Kaurenóico (AK) na permeabilidade intestinal com azul de Evans pode ser vistos nas **TABELA 5**.

O grupo pré-tratado com indometacina foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,01$) ($104,26 \pm 9,19$), a permeabilidade intestinal, quando comparado ao controle não tratado ($50,53 \pm 3,50$).

O rofecoxib não alterou de forma significativa ($58,17 \pm 3,96$) a permeabilidade intestinal, quando comparado ao controle não tratado ($50,53 \pm 3,50$), porém quando administrado juntamente com a indometacina ($183,82 \pm 17,08$) ($p < 0,001$) foi capaz de potencializar a permeabilidade exercida pela indometacina sozinha ($104,26 \pm 9,19$).

Os grupos pré-tratados com ORCL 200 e 400 não foram capazes de alterar de forma significativa ($47,74 \pm 3,70$; $59,92 \pm 4,64$, respectivamente) a permeabilidade intestinal, quando comparado ao controle não tratado ($50,53 \pm 3,50$). Quando ORCL 200 e 400 foram administradas juntamente com indometacina o grupo do ORCL 400 ($168,22 \pm 18,16$) ($p < 0,001$) foi capaz de potencializar a permeabilidade exercida pelo grupo da indometacina ($104,26 \pm 9,19$).

AK 50, mas não o AK 100, foi capaz de aumentar de forma significativa ($200,55 \pm 13,05$) a permeabilidade intestinal, quando comparado ao controle não tratado ($50,53 \pm 3,50$).

TABELA 5 – Efeito do óleo resina da *Copaifera langsdorffii* e ácido kaurenóico na avaliação da permeabilidade intestinal no modelo de azul de Evans em camundongos.

GRUPOS	N	Concentração de azul de Evans (g) / g de tecido x 10 ⁻⁵
Tratamento (v.o.)		Média ± E.P.M.
Controle não tratado	6	50,53 ± 3,50
Indometacina (20mg/Kg)	7	104,26 ± 9,19** ^a
Rofecoxib (5mg/Kg)	6	58,17 ± 3,96** ^b
Rofecoxib (5) + INDO (20)	6	183,82 ± 17,08*** ^b *** ^c
ORCL (200mg/Kg)	6	47,74 ± 3,70*** ^b
ORCL (200) + INDO (20)	7	144,32 ± 14,20* ^b * ^c
ORCL (400mg/Kg)	4	59,92 ± 4,64* ^b
ORCL (400) + INDO (20)	5	168,22 ± 18,19*** ^b *** ^c
AK (50mg/Kg)	6	200,55 ± 13,05*** ^b
AK (50) + INDO (20)	6	161,76 ± 17,18*** ^b *** ^c
AK (100mg/Kg)	5	116,68 ± 12,12 ^(ns)
AK (100) + INDO (20)	7	86,58 ± 6,84 ^(ns)

ORCL=óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e AK=ácido kaurenóico.

Student Newman-Keul's test, * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001; quando comparado ao controle não tratado (a); quando comparado a indometacina (b); quando comparado ao tratamento sem indometacina (c); (ns) não significativo.

Tratamento com indometacina e/ou rofecoxib foi realizado 6h antes da cirurgia, quando administrado em associação foi dado um intervalo de 30 minutos entre estes, Os tratamentos com ORCL e AK foram administrados 2h antes da cirurgia e quando administrados em associação com a indometacina, 30 minutos antes desta.

5.7. ATIVIDADE CICATRIZANTE

5.7.1.Ferida aberta

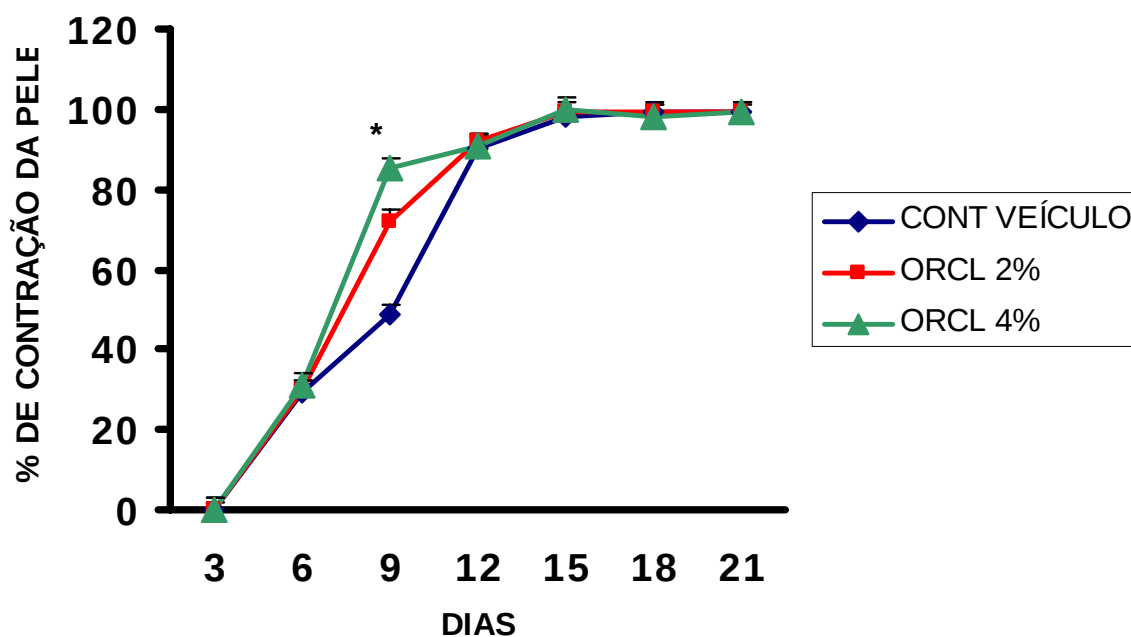
Como podemos ver na **FIGURA 30** os animais tratados com veículo tiveram contração de $51,29\% \pm 9,54\%$ dos 2cm originais até o nono dia e o percentual dos animais tratados com ORCL (2% e 4%) foi da ordem de $72,10\% \pm 7,37\%$ e $84,05 \pm 2,37\%$, respectivamente. O progresso na contração foi o mesmo nos dias seguintes 12, 15, 18 e 21.

5.7.2.Ferida por incisão

Os resultados da aplicação tópica de ORCL na incisão linear pode ser observado na **FIGURA 31** . O grupo tratado com ORCL 4% mostrou um aumento significativo (99%) no 5º dia da exposição a tensão (cont. veículo $33,95 \pm 7,44\text{g/cm}$ e ORCL 2% $51,97 \pm 9,13\text{g/cm}$ e ORCL 4% $71,48 \pm 5,77\text{g/cm}$).

A **FIGURA 32** mostra uma foto de animais que foram submetidos ao modelo de ferida aberta por incisão.

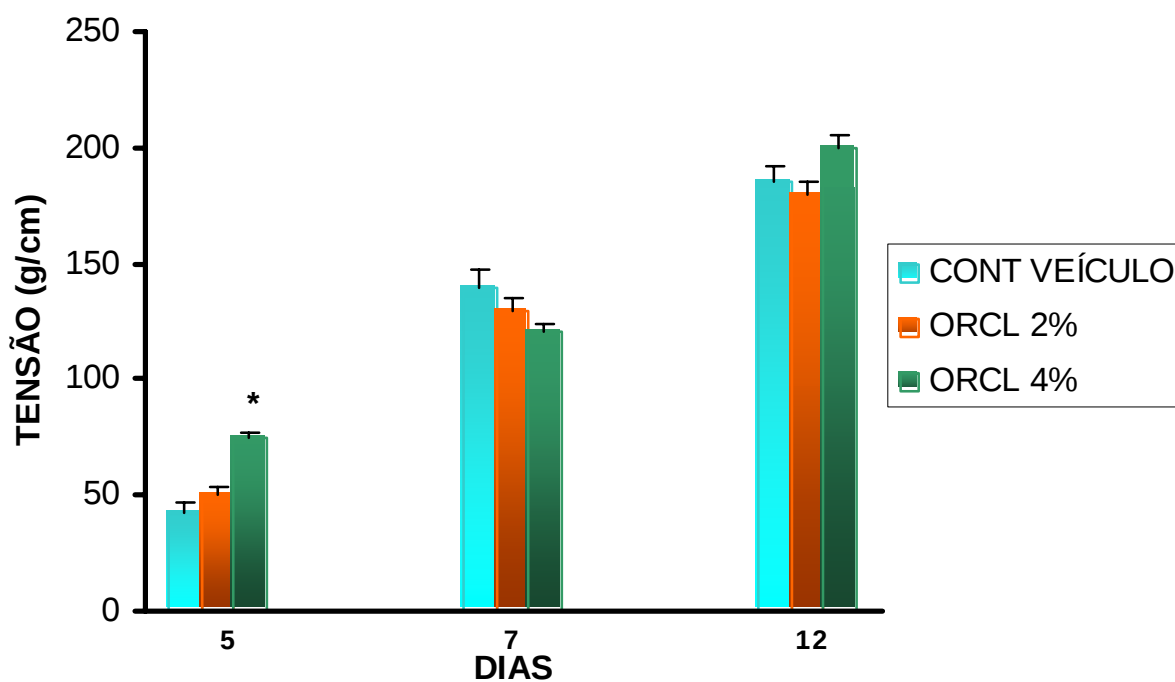
FIG 30. Efeito do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) na contração da pele no modelo de ferida aberta.



Efeito do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) na contração da pele da ferida aberta. ORCL ou o veículo foram aplicados topicamente todos os dias, durante vinte e um dias. Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. * $p < 0.05$ vs controle veículo.

FIG 31. Efeito do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) na contração da pele no modelo de ferida por incisão.

,0



Efeito do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) na resistência a tensão. ORCL ou o veículo foram aplicados topicamente todos os dias, durante doze dias. Os dados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM de 6 ratos. * $p < 0.05$ vs controle veículo.

FIG 32. Foto de animais que foram submetidos ao modelo de ferida por incisão.



CONT VEÍCULO - ORCL 2% - ORCL 4%

6.DISSCUSSÃO

6.DISCUSSÃO

Óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* (ORCL) e Ácido Kaurenóico (AK) no modelo de colite induzida por ácido acético (AA) e TNBS.

O óleo de copaíba destaca-se dentre as substâncias medicinais de uso popular, sendo frequentemente utilizado como antiinflamatório ou cicatrizante (VIARA, L. S. Fitoterapia da Amazônia. São Paulo: EAC, 1992). A forma de utilização pode ser tópica, vaginal, oral, dentre outras. Experimentalmente, Fernandes *Et al.*, 1992, verificaram o efeito antiinflamatório do óleo de copaíba, inibindo o edema de pata induzido pela carragenina em ratos e Paiva *Et al.*, 2000, demonstraram em ratos, seu efeito gastroprotetor contra lesões gástricas induzidas por estresse, indometacina e etanol. Entretanto, apesar do óleo de copaíba ser amplamente utilizado pouco se conhece a respeito do seu efeito no trato intestinal. Portanto, neste estudo primeiro verificamos a eficácia do óleo-resina de copaíba em modelos animais de inflamação intestinal induzidos por ácido acético, TNBS, isquemia-reperfusão e indometacina. Segundo verificamos o efeito deste óleo na contração da pele em modelos de ferida aberta e incisão, na tentativa de validar o uso popular do óleo-resina de copaíba na cicatrização de feridas.

A Doença inflamatória intestinal (DII), que compreende colite ulcerativa e doença de Crohn, é uma condição crônica que afeta principalmente à parte distal do intestino e apresenta períodos alternados de inflamação e remissão dos sintomas. Normalmente a fisiologia do intestino é um balanço entre a ativação e controle da resposta imune. Atualmente não está claro se a resposta imune causa a colite ulcerativa e a doença Crohn, muitas teorias existem, mas não explicam adequadamente esta patologia. Uma outra teoria descreve que o aumento da permeabilidade da mucosa está associado a pacientes com doenças inflamatórias intestinais. A mais plausível teoria é que as DIIs alteram o funcionamento do sistema imune causando uma proliferação anormal de citocinas, antígenos, linfócitos e anticorpos. Indiferente ao mecanismo exato, o sistema imune é

ativado e ocorre o dano na mucosa na DII. Ambos, colite ulcerativa e doença de Crohn, são condições inflamatórias crônicas, a primeira afeta o cólon e a última mais comumente afeta o intestino delgado, podendo se estender ao cólon. Caracteristicamente a mucosa na colite ulcerativa progride para ulceração com pseudopólipos. Em ambas as doenças há um aumento de adenocarcinomas no cólon. A etiologia da DII permanece desconhecida e o tratamento farmacológico é carente de opções (SANDS, 2000), portanto, a procura por novas linhas de terapia é pertinente. O maior objetivo do presente estudo é averiguar se ORCL e seu constituinte AK têm um efeito no estágio inicial da colite induzida por AA e TNBS. O óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e seu constituinte diterpênico ácido kaurenóico têm mostrado ser antiinflamatório, nossa hipótese é que eles exerçam sua atividade abrandando os danos provocados pelo AA ou TNBS e detenham a progressão da reação inflamatória.

Nos anos recentes têm surgido significativos avanços sobre o curso da doença, patogênese, e opções terapêuticas para colite ulcerativa. É evidente que o avanço na busca da elucidação da DII oferecerá ao clínico novas perspectivas no cuidado e acompanhamento dos pacientes. No presente estudo, nós mostramos que ORCL e AK previnem lesões teciduais em ratos, no modelo de colite induzida por ácido acético e TNBS, observado por seus efeitos em alterações macroscópicas, histológicas e bioquímicas. A colite induzida por ácido acético é um dos modelos experimentais mais utilizados para avaliar substâncias nesta condição (MACPHERSON & PFEIFFER, 1978; SHARON & STENSON, 1985; NOA *et al.*, 2000) onde mediadores inflamatórios como espécie reativa de oxigênio, aminas vasoativas e eicosanóides desempenham um papel proeminente (SEO *et al.*, 1995; LOGUERCIO *et al.*, 1996; CARTY *et al.*, 2000).

Estudos anteriores indicam que radicais livres derivados de oxigênio como, superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO) e radical hidroxila (OH), têm um papel nos danos teciduais que ocorrem na DII. O intestino produz enzimas capazes de gerar radicais livres (PARKS, 1989). Tem sido colocado que na colite ulcerativa, episódios passageiros de isquemia com subsequente reperfusão produzem níveis

altos de radicais livres (GRISHAM & GRANGER, 1988). Este processo inicia uma cascata de eventos que leva ao recrutamento e ativação de leucócitos, resultando em ulceração da mucosa. Existem baixos níveis de antioxidantes endógenos na mucosa do cólon. O resultado de um estresse oxidativo pode facilmente sobrepor as defesas endógenas que regulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BLAU *et al.*, 1999). Estas espécies são citotóxicas, induzindo lipoperoxidação e outro estresse oxidativo por destruir proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, causando uma deficiência celular, lesão, e eventualmente morte. Há evidências consistentes que na biópsia de pacientes com colite ulcerativa, os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio são promovidos pelo aumento na lipoperoxidação (GRISHAM, 1994). Foi sugerido que o desequilíbrio no mecanismo da DII, entre pró-oxidantes e antioxidantes, pode ser controlado por um tratamento antioxidante. Alguns agentes como N-acetilcisteína, sulfasalazina, L-glutamina, flavonóides etc., que são destruidores de radicais livres foram efetivos em prevenir colite experimental induzida por ácido acético e TNBS (AUROMA *et al.*, 1987; KAYA *et al.*, 1999; NOSÁLOVÁ *et al.*, 2000; SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 2002).

Em nossos estudos, ORCL e AK demonstraram diminuir vários parâmetros da inflamação no cólon, como o escore da lesão e peso úmido do intestino, dependendo da dose e via de administração. O peso úmido do tecido inflamado é considerado um indicador confiável e sensível da severidade e extensão de resposta inflamatória (RACHMILEWITZ *et al.*, 1989). As substâncias teste foram capazes de reduzir significativamente o peso úmido e o escore da lesão, comparado ao controle que recebeu o veículo. Em alguns modelos, a dose mais alta não foi muito efetiva e as razões para este achado são difíceis de explicar. Provavelmente estas substâncias podem funcionar com limitada capacidade antioxidante.

Também, ORCL e AK foram eficazes em reduzir os sinais histológicos de inflamação como, infiltração de leucócitos, edema e dano de tecido. Os neutrófilos desempenham um papel crucial na produção de ânion superóxido gerando uma

cascata de várias espécies reativas com formação de radical hidroxila e água oxigenada que contribuem significativamente para a necrose de tecido e deficiência orgânica (BAKER & CAMPBELL, 1991; SALIM, 1992; GRISHAM, 1994). Nossos resultados mostram que ambos, ORCL e AK podem reduzir a atividade de MPO associada com a colite induzida por ácido acético. MPO é uma enzima lançada por estímulos inflamatórios através da ativação de grânulos de armazenamento no neutrófilo e que catalisa a formação de várias espécies reativas (KETTLE, 1997). Uma redução na atividade desta enzima pode ser interpretada como uma manifestação da atividade antiinflamatória (VELJACA *et al.*, 1995). O aumento na atividade da MPO pode ser correlacionado positivamente com o aumento em níveis de MDA indicando um aumento em lipoperoxidação no grupo controle do ácido acético. Além da inibição da mieloperoxidase, eles também suprimiram o nível aumentado de malonaldeído associado com colite induzida por ácido acético. O aumento da lipoperoxidação que acontece no tecido do cólon pode iniciar um ciclo maligno que gera cada vez mais metabólitos reativos, exaurindo os antioxidantes celulares, vitamina C e E em última instância favorecem o desenvolvimento conseqüente de inflamação e ulceração adicional. É então razoável assumir que os tratamentos melhoram o estresse oxidativo que ocorrem animais com colite porque as substâncias teste podem reduzir o nível de MDA, um bom indicador de lipoperoxidação (OHAKWA *et al.*, 1979) e atividade de MPO, um marcador de leucócitos polimorfonucleares (BRADLEY *et al.*, 1982). Em adição, eles eficazmente reduziram os sinais histológicos de inflamação como infiltração de leucócitos, edema e dano tecidual. A atividade oxidativa de radicais livres é uma causa importante de lesão tecidual na inflamação (KRUIDENEIR e VERSPAGET, 1998). Neutrófilos desempenham um papel crucial nesta consideração por produzir ânions superóxido e uma cascata de várias espécies reativas que leva a uma produção de radical hidroxila e água oxigenada (BAKER & CAMPBELL, 1991; SALIM, 1992). Os efeitos antiinflamatórios dos grupos cauranos e diterpenos têm estado recentemente descritos e parecem prejudicar a sinalização inflamatória por inibição de fatores nucleares como NF-kappaB. Como o ácido kaurenóico suprimiu a severidade da colite induzida por ácido acético, nós presumimos que inibiu a atividade do NF-kB que regula a transcrição de várias

citocinas inflamatórias (TAK & FIRESTEIN, 2001). Os efeitos antiinflamatórios desta substância no modelo animal de colite pareceu consistente com observações antigas que demonstram sua habilidade em inibir o edema de pata induzido por carragenina em ratos (FERNANDES *et al.*, 1992).

A colite induzida por TNBS também é um modelo experimental comumente utilizado para o estudo de novas drogas com atividade nas doenças inflamatórias intestinais (WALLACE, 1988; YOSHIKAWA *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1999) em que mediadores inflamatórios como espécies reativas de oxigênio, aminas vasoativas e eicosanoides desempenham um papel proeminente (SEO *et al.*, 1995; LOGUERCIO *et al.*, 1996; CARTY *et al.*, 2000). O TNBS modelo de colite é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda intensa imediata com necrose da mucosa seguida por uma fase prolongada de cicatrização das lesões da mucosa e progressão para uma resposta tipo crônico (NEURATH *et al.*, 2000). Neste modelo de colite, os efeitos terapêuticos sobre as lesões da mucosa e úlcera de drogas conhecidas como potentes antiinflamatórios, dexametasona ou metilprednisolona, têm sido difíceis de demonstrar (FRIES *et al.*, 1998). Em nossas experiências com ratos, a fase aguda de colite de TNBS está associada significativamente ao aumento de MPO e MDA, mas realçado com níveis baixos de catalase, indicando um agudo estresse oxidativo. O ORCL mostrou eficácia neste modelo experimental de colite. ORCL significativamente reduziu o peso úmido e escore da lesão, comparados com o controle que recebeu o veículo. É interessante mencionar que a infiltração de neutrófilos está associada à atividade da MPO, e esta foi, mais uma vez, alterada pelo tratamento com ORCL assim como o dano tecidual e edema, observados nas análises histológicas. Isto presumivelmente reflete uma outra contribuição para o dano tecidual e edema por outras células inflamatórias, especialmente macrófagos e linfócitos. Neutrófilos desempenha um papel crucial no desenvolvimento de danos teciduais, como foi demonstrado em muitos modelos de lesão gástrica e intestinal (GRISHAM *et al.*, 1990; KVIETZ *et al.*, 1990; MATSUMOTO *et al.*, 1993) por produzir superóxido e uma cascata de várias espécies reativas que levam a uma formação de radical hidroxila e água oxigenada (BAKER e CAMPBELL, 1991; SALIM, 1992). Os efeitos benéficos de ORCL nas

lesões teciduais que ocorrem na colite não podem ser, necessariamente, devido à diminuição da atividade da MPO ou reabastecimento de glutathione. Porém, estes efeitos do ORCL podem contribuir para uma diminuição nas lesões teciduais como foi observado com outras substâncias como silimarim e n-acetilcisteína (NOSALÒVA *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2001). Como os neutrófilos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da inflamação intestinal (GRISHAM, 1994), nós sugerimos que o efeito benéfico de ORCL na colite induzida por TNBS é devido a sua capacidade em diminuir a infiltração de neutrófilos no cólon.

ORCL e Isquemia/Reperusão

O intestino delgado é altamente sensível aos danos causados pela isquemia/reperusão (I/R). A isquemia aguda mesentérica é uma emergência vascular que pode exigir um primeiro diagnóstico e intervenção adequada para restabelecer o fluxo de sangue mesentérico, para prevenir a necrose do intestino e morte do paciente (OLDENBERG *et al.*, 2004). O pronto atendimento é essencial para melhorar o resultado clínico. A isquemia/reperusão ativa uma resposta inflamatória complexa que inclui, ativação do sistema complemento, agregação e migração de neutrófilos polimorfonucleares, e aumenta o número de vários derivados de oxigênio, radicais livres, que são responsáveis pelo dano tecidual (SCHWARZ *et al.*, 1999; BALOGH *et al.*, 2002). Um modelo animal de oclusão passageira da artéria mesentérica superior foi usada neste estudo para verificar o efeito de potencial benéfico de ORCL na lesão tecidual causada pela I/R. Os danos intestinais observados foram, hiperemia e níveis elevados de MPO, MDA, catalase, e nitrito com uma redução nos níveis de glutathione. Estas alterações foram notadamente inibidas pelo pré-tratamento com ORCL administrado por via oral nas doses de 200 e 400 mg/kg. Os estudos anteriores demonstraram a eficácia de vários extratos de plantas que possuem atividades antioxidante e antiinflamatória como *Ginkgo biloba* e *Artemisia vulgaris* em minimizar as lesões intestinais associadas a I/R (TIGNO & GUILA, 2000; PEHLIVAN *et al.*, 2002). A perfusão microvascular que ocorre após a isquemia é associada com infiltração de células inflamatórias, aumentando a interação leucócito-célula-endotelial e

lançando mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2000; BRAUN *et al.*, 2002). Ocorre aderência de neutrófilos ativados ao endotélio microvascular secretando a enzima MPO e favorecendo a formação de ROS com subsequente dano tecidual (WELBOURN *et al.*, 1991; KETTLE *et al.*, 1997; CARDEN e GRANGER, 2000). Radicais livres de oxigênio iniciam a lipoperoxidação danificando proteínas que podem responder pela necrose celular associada com a reperfusão (ZIMMERMAN & GRANGER, 1992). Foi demonstrado que durante a reperfusão, o oxigênio molecular reage com xantina oxidase e hipoxantina para produzir radicais livres de oxigênio (GRANGER, 1986).

Neste estudo, ORCL na dose mais alta reduziu a MPO, um marcador bioquímico da infiltração de neutrófilo no tecido lesionado e assim protegeu o tecido do estresse oxidativo associado a I/R. A atividade da catalase foi aumentada nos tecidos homogenizados no grupo controle I/R quando comparado ao controle veículo. A catalase é uma enzima protetora extensamente distribuída, que catalisa a degradação de H_2O_2 , um forte agente oxidante biológico (FOREMAN & TORRES, 2001) e níveis aumentados de catalase estão associados as lesões teciduais que ocorrem no modelo de I/R podendo representar um sistema biológico contra reações oxidantes deste tecido. Uma observação semelhante foi feita por Esposito *et al.* (2003) em polpas dentais inflamadas em humano. Estes autores acharam um aumento da atividade da catalase em polpa dental inflamada quando comparado ao tecido saudável. De maneira interessante, o pré-tratamento com ORCL mostrou valores significativamente mais baixos de catalase e MDA quando comparados ao grupo tratado com veículo. Dado que o nível de produção de H_2O_2 é alto em área intestinal (HALLIWELL *et al.*, 2000), ORCL com suas propriedades antioxidante e anti-lipoperoxidativa podem ter eficazmente modulado a catalase e MDA para níveis muito mais baixos que os valores basais.

Os níveis de glutathiona (GSH) no intestino de ratos submetidos a I/R foi significativamente mais baixo que o grupo tratado com veículo, e o pré-tratamento com ORCL significativamente alterou isto. Em um estudo prévio, nós observamos que ORCL no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, promove uma

depleção de GSH na mucosa, oferecendo gastroproteção (Paiva *et al.*, 1998). A GSH é um agente protetor extremamente importante e diretamente extermina radicais livres (KIDD, 1997). Além da inibição da mieloperoxidase, ORCL reverteu a diminuição nos níveis de glutathione associada a I/R. A GSH é um dos mais abundantes antioxidantes intracelulares e que desempenha um papel essencial em proteger células dos danos oxidativos (YU, 1994). A água oxigenada formada por peroxidação lipídica é decomposta pela glutathione peroxidase, usando dois mols de glutathione por mol de água oxigenada metabolizada. A glutathione oxidada deixa a célula mais prontamente do que a forma reduzida, deste modo facilita a sua depleção (HOGEBERG *et al.*, 1975). É então, razoável assumir que o tratamento com ORCL melhorou o equilíbrio oxidativo do cólon em animais com colite, porque reduziu a atividade da mieloperoxidase, um marcador do acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (BRADLEY *et al.*, 1982) e aumentou os níveis teciduais de antioxidante, a glutathione. Desde que ORCL modulou a depleção de GSH, nós assumimos que este é dotado de propriedade antioxidante.

A produção de óxido nítrico (NO) pelo óxido nítrico sintase induzida (NOSi) foi mostrado que está associada às lesões intestinais induzidas por I/R (TURNAGE *et al.*, 1995). Foi demonstrado que inibidores seletivos de NOSi podem atenuar a hemodinâmica e desarranjo microcirculatório resultante da I/R intestinal (CHEN *et al.*, 2000; NAITO *et al.*, 2004). A inibição significativa de ORCL no aumento de nitrito associado a I/R sugere que um excesso de NO, produzido por NOSi, pode ter contribuído para a iniciação/amplificação das lesões inflamatórias intestinais pelos vários mecanismos inclusive, danos oxidativos e nitroativos como também o aumento de citocinas inflamatórias.

Recentemente, o fator nuclear κ B (NF- κ B) foi implicado no dano intestinal induzido por I/R (CHEN & WANG, 2004; NICHOLS, 2004). A via de produção do NF- κ B é cíclica na resposta inflamatória regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas induzíveis e deste modo desempenha um papel maior nas desordens inflamatórias agudas e crônicas como também na resolução de inflamação (BARNES *et al.*, 1997; LAWRENCE *et al.*,

2001; GHOSH & KARIN, 2002). CHEN *et al.* (2003) estudaram o papel do NF- κ B na inflamação aguda que ocorre na I/R intestinal pela separação seletiva de I κ B kinase (IKK)- β , a subunidade catalítica de IKK que é essencial para ativação de NF- κ B. A separação de IKK- β em enterócitos preveniu a resposta inflamatória sistêmica que, caso contrário, normalmente culmina em síndrome de deficiência orgânica de órgão múltiplo. Porém, a remoção de IKK- β também resultou em severa apoptose na reperusão da mucosa intestinal. Estes resultados de CHEN *et al.* (2003) refletem a função dúbia do sistema de NF- κ B, que é responsável por ambas, a proteção do tecido e inflamação sistêmica, e ressalta a precaução que deve ser tomada em usar inibidores de NF- κ B e IKK.

Existem trabalhos mostrando várias substâncias derivadas de plantas que contenham diterpenos apresentando atividade capazes de inibir a ativação do NF- κ B e assim inibir a cascata inflamatória (CASTRILLO *et al.*, 2001). Um papel essencial da microbiota intestinal é o de facilitar respostas inflamatórias agudas (SOUZA *et al.*, 2004). Estes autores demonstram que em animais livre de microorganismos, o dano intestinal era bem menor quando comparados a animais normais submetidos a I/R intestinal. O ácido presente no ORCL é um diterpeno kaurenóico que tem propriedade bactericida e também é capaz de inibir a ativação de NF- κ B (WILKENS *et al.*, 2002; GIANG *et al.*, 2003). Estes possíveis efeitos do ORCL podem ter favorecido no controle efetivo das lesões inflamatórias intestinal nos grupos de animais tratados com ORCL no modelo de isquemia/reperusão.

Óleo-resina de Copaiba no modelo de toxicidade intestinal induzida por indometacina.

A permeabilidade no intestino delgado é freqüentemente alterada em pacientes com doença de Crohn e pode desempenhar um papel patogênico (FRIES *et al.*, 1999). A inibição de COX estimula os nervos entéricos que afetam motilidade, secreção alcalina e permeabilidade no duodeno de rato (NYLANDER *et al.*, 2001). O uso prolongado ou de altas doses de inibidores não-seletivos de COX (indometacina, naproxeno, piroxicam, sulindac, diclofenaco) ou inibidores seletivos

de COX-2 (rofecoxibe, celecoxibe, etodolaco, nimesulda, parecoxibe e etoricoxibe) podem causar danos gastrointestinais (SIGTHORSSON *et al.*, 2002). Inibidores seletivos de COX-1, dex-ketoprofene não induz nenhum dano ao trato gastrointestinal, mas o não-seletivo induz complicações gastrintestinais e COX-2 seletivo aumentou os riscos de trombose e efeitos adversos cardíacos.

Os antiinflamatórios não-esteroidais em geral causam erosões agudas e induzem úlceras crônicas que resultam em hospitalizações e morte por causa de hemorragia e perfuração. Ambos, indometacina e rofecoxibe parecem produzir efeitos adversos indesejáveis no intestino. Lesões induzidas por indometacina são mais severas, ela induz mucositis, alterações morfológicas, aumenta a permeabilidade da mucosa e uma resposta pró-inflamatória. A administração de indometacina aumenta permeabilidade intestinal em ratos e induz patologias inflamatórias no intestino delgado (STEWART *et al.*, 1980) e este representa um modelo para doença do Crohn (COLPAERT *et al.*, 2001). Indometacina (1-(4-clorobenzol)-5-metoxi-2-metil-1H-indole-3-ácido acético) é um inibitor não seletivo de COX e inibe a formação de prostanoídes. Em adição aumenta a síntese de leucotrieno, outros mecanismos possíveis foram propostos para a indução de inflamação de intestino. Entre os mecanismos sugeridos estão (1) a fosforilação oxidativa levando a diminuição da capacidade de reserva de ATP celular (SOMASUNDARAM *et al.*, 1995); (2) inibição da atividade de desaturação que leva a um desequilíbrio composição ácida gordurosa relativa entre saturada vs. poliinsaturada da membrana da célula epitelial (COOPER, 1977); (3) ação detergente na borda de escova, alterando as propriedades da camada de muco (GULLIKSON *et al.*, 1982); e (4) deposição de fibrina intra-vascular (ANTHONY *et al.*, 1996) juntamente com vasoconstricção esplânica (FIEGEN *et al.*, 1981) levando a uma isquemia local. O aumento de macrófagos produtores de TNF tem sido divulgado em condições de aumento da permeabilidade intestinal em colite experimental (TATEISHI *et al.*, 1997) e a terapia com anti-TNF também foi eficaz em suprimir a toxicidade intestinal induzida por indometacina (COLPAERT *et al.*, 2001). Isto sugere que a indometacina exerce sua ação na permeabilidade intestinal via um mecanismo TNF dependente. A permeabilidade intestinal

aumentada (síndrome de intestino frouxo) não acontece só com o uso de NSAIDs como a indometacina, mas também em alergias a alimentos, uso de antibióticos, excessos de bebida alcoólica, infecções parasitárias, na aids, asma e artrite.

Neste estudo, nós resolvemos investigar os efeitos de ORCL e AK em comparação com o inibidor seletivo COX-2, rofecoxibe no modelo de permeabilidade induzida por indometacina no intestino delgado de camundongos. Os resultados obtidos mostram que indometacina e AK aumentam a permeabilidade quando comparada com o grupo que recebeu apenas o corante azul de Evans. O efeito observado da indometacina na permeabilidade intestinal é consistente com estudos anteriores (COLPAERT *et al.*, 2001). Em contraste, ambos, ORCL e rofecoxibe quando administrados isolados, demonstraram uma diminuição na permeabilidade. Porém, estas substâncias em combinação com indometacina produziram um aumento maior ainda da permeabilidade intestinal. Estas observações são consistentes com trabalhos anteriores (LAUDANNO *et al.*, 2002; SIGTHORSSON *et al.*, 2002) foi demonstrado uma resposta inflamatória exagerada com necrose e lesões erosivas gastrointestinais quando drogas seletivas de COX-1 ou não seletivas são combinadas com agentes seletivos COX-2. A inibição de COX-2, desde que o COX-1 é ativado, existirá um aumento na expressão de COX-2 favorecendo a regeneração de PGE, que é citoprotetora. A inibição das duas, COX-1 e COX-2, induzem lesões (LAUDANNO *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2002). Quando COX-1 e COX-2 são inibidas não existe nenhuma expressão de COX-2 e isto pode causar danos teciduais (TANAKA *et al.*, 2002).

ORCL

Na medicina tradicional ORCL é extensamente empregado para tratar feridas e úlceras (PIO CORRÊA, 1984). O óleo-resina da Copaíba está comercialmente disponível para uso oral ou para aplicação tópica e seu efeito antimicrobiano foi previamente descrito. Apesar do seu uso popular, não existia nenhum dado publicado sobre sua capacidade de cicatrização de feridas. Então o presente estudo examinou se ORCL pode promover a cicatrização de feridas em

experimentos cutâneos. A cicatrização de feridas envolve três diferentes fases: inflamação, formação de tecido de granulação, e formação de matriz e remodelamento (CLARK, 1985).

A fase inflamatória acontece logo depois do ferimento ocorrer e dura mais ou menos 5 dias, durante este período existe a produção de mucopolissacarídeos e precursores de proteína solúveis de colágeno, acontece então a formação de tecido de granulação, com proliferação de fibroblastos e a formação de poucos vasos sangüíneos que definha ao redor do sétimo dia depois do início do ferimento. Neste estudo, a aplicação tópica de ORCL, em uma concentração de 4%, significativamente aumentou a contração da ferida no no dia. A contração do ferimento na fase rápida (7-9 dias) é mais relevante para ser estudada do que as fases mais velhas (depois de 12 dias), pois o percentual de contração do ferimento após este período quase cessou (CROSS *et al.*, 1995). Foi sugerido que o fator comum na contração de feridas é a atividade de fibroblastos (microfibroblastos), estes são encontrados no tecido de granulação de cicatrização de feridas (GABBIANI *et al.*, 1971). Vários fitoconstituintes presentes no ORCL, como diterpenos, e ou a presença de algum fator de crescimento desconhecido, como fator de crescimento de transformação, promova a formação de colágeno (MUSTOE *et al.*, 1987) e poderia ter contribuído para contração primária da ferida.

Um aspecto importante da cicatrização de ferida depois da incisão cirúrgica pode ser a geração de resistência à tensão, que pode medir a propriedade de cicatrização do tecido. Depois da remoção de sutura no quinto dia, a força medida reflete a formação do colágeno novo (NAGI & ZINGG, 1971). O tratamento com ORCL (4%) aumentou a resistência à tensão no quinto dia de cicatrização indicando significativamente que ORCL pode acelerar a cicatrização do ferimento. A deiscência da ferida normalmente acontece dentro dos primeiros sete dias depois de cirurgia. Deste modo, um aumento na primeira fase de resistência à tensão notada no modelo de incisão pode levar a uma redução em complicações na cicatrização da ferida.

Muitos fatores gerais e locais como infecção, destruição de proteína, doença (uremia, icterícia), drogas citotóxicas e antimetabólicas, deficiência de vitamina C e zinco, etc. podem influenciar negativamente no acúmulo de colágeno e/ou ganho de força mecânica (BURNS *et al.*, 2003). O reparo do tecido de embriões é rápido, eficiente e perfeito e não deixa uma cicatriz, uma habilidade que é perdida como resultado do desenvolvimento. Uma diferença chave na cicatrização entre o embrião e o adulto que pode explicar porque no embrião se cura perfeitamente e no adulto deixa cicatrizes, é a presença de uma resposta inflamatória local no adulto, o que não ocorre no embrião. Estudos na cicatrização de ratos PU.1 nulo, que é geneticamente incapazes de criar uma resposta inflamatória, mostra que a inflamação realmente pode ser, em parte, responsável pela cicatrização, e estudos genéticos de inflamação em larvas zebrafish (*Danio rerio*) sugerem que a identificação das rotas genéticas modulando o recrutamento de células inflamatórias pode ser o modo de melhorar a cicatrização no adulto (REDD *et al.*, 2004). Em homem e animais domésticos, cicatrização na pele depois de trauma, cirurgia, queimadura ou dano de esporte é um problema médico grande, freqüentemente resultando em estética adversa, perda de função, restrição de movimento de tecido e/ou crescimento de efeitos psicológicos adversos. Os tratamentos atuais são empíricos, incertos e impossíveis de prever: não existe nenhuma droga de prescrição para a prevenção ou tratamento da cicatrização. Os ferimentos de pele em embriões se curam perfeitamente sem cicatrizes comparando com a cicatriz de adulto. Fibroblastos da cavidade oral expressam um fenótipo que é responsável pela falta de tecido de cicatrização depois da lesão, uma característica não associada com fibroblastos da pele (LALANI *et al.*, 1998). FERGUSON & O 'AKNE (2004) investigaram as diferenças celulares e moleculares entre a não cicatrização do embrião e a formação de cicatriz no adulto, as diferenças importantes incluem a resposta inflamatória, que em ferimentos de embrião consiste em números mais baixos de com menos células inflamatórias diferenciadas. Este, junto com níveis altos de moléculas morfogenética envolvidas em crescimento de pele, significando que o perfil de fator de crescimento na cicatrização de um ferimento de um embrião é muito diferente daquele em um ferimento de adulto. Deste modo, ferimentos de embrião

se curam sem uma cicatriz, tem níveis baixo de TGFbeta1 e TGFbeta2, níveis baixos de fator de crescimento derivados de plaquetas e níveis altos de TGFbeta3. Isto significa que a cicatrização pode não ser mais uma consequência inevitável do ferimento ou cirurgia e que uma abordagem completamente nova agora é possível para a prevenção da cicatriz em humanos. A cicatriz depois da lesão pode acontecer em muitos tecidos além da pele. Deste modo, as drogas que melhoram as cicatrizes podiam ter benefícios difundido e prevenir complicações em vários tecidos, por exemplo, prevenção de cegueira depois de cicatriz devido a lesão no olho, facilitação de reconexões neuronal no sistema nervoso central e periférico, restituição de intestino normal e função reprodutiva prevenindo adesões depois de lesões no sistema gastrointestinal ou reprodutivo, e restauração da função locomotora prevenindo cicatrizes em tendões e ligamentos. Experimentalmente, cicatrização em feridas de ratos, pudo imitar o perfil do embrião livre de cicatriz, por exemplo, neutralizando PDGF, neutralizando TGFbeta1 e TGFbeta2 ou adicionando TGFbeta3 exógeno (FERGUSON & O'AKNE, 2004). Estas experiências resultam em ferimento livre de cicatriz no adulto. Tais experiências permitem a identificação de objetivos terapêuticos para desenvolver moléculas farmacêuticas inovadoras, que notadamente melhorem ou completamente previnam a cicatrização. Nossas experiências indicam que ORCL minimiza a formação de cicatriz, porém, precisa ser investigado se TGFbeta3 está envolvido no efeito de cicatrização de ORCL.

Nas doses testadas ORCL (200 e 400 mg/kg) e AK (50 e 100 mg/kg) não manifestaram sinais de toxicidade ou anormalidade de comportamento. Então, nós consideramos que as doses empregadas são seguras e livres de toxicidade. Porém, ORCL em uma dose relativamente mais alta (1.6 g/kg) pode induzir diarreia, mas nenhuma outra mudança comportamental e foi administrado via oral ORCL e AK em doses até 5 g/kg e 3 g/kg, respectivamente, sendo incapaz de produzir qualquer anormalidade em ratos (observações inéditas). Os dados presentes sugerem que ORCL e ou seu componente podem prevenir inflamação intestinal experimental e que este efeito protetor pode pelo menos em parte envolver um mecanismo antioxidante que merece uma avaliação adicional para

sua utilização terapêutica na prevenção e tratamento de doença de intestino inflamatória não específica.

7.CONCLUSÃO

7.CONCLUSÃO

ORCL previne danos teciduais no modelo de colite induzido por ácido acético como foi verificado através de seus efeitos em alterações macroscópicas, histológicas e bioquímicas e da mesma maneira foi eficiente na colite induzida por TNBS em ratos.

Os tratamentos com ORCL e AK tem um impacto benéfico no estresse oxidativo com uma significativa atividade antiinflamatória, em colite experimental induzida por ácido acético e TNBS em ratos.

As investigações prévias e presentes sugerem que ORCL possua um potencial antiinflamatório destituído de efeitos colaterais gástricos e intestinais.

ORCL atenua significativamente a lesão intestinal induzida por I/R em rato através da oclusão da artéria mesentérica superior.

ORCL é capaz de prevenir a lesão intestinal induzida por indometacina em ratos.

Diferentemente de indometacina e AK, ORCL não aumenta permeabilidade intestinal, mas em combinação com indometacina ele causa um significativo aumento até certo ponto semelhante ao rofecoxibe.

ORCL acelera a cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos. Não só apressa a contração do ferimento, mas também, realça a resistência a tensão da ferida. Estes resultados confirmam o uso benéfico de ORCL na medicina tradicional sul-americana.

8.BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABDULLIM, K. H. **Uchen. Zap. Kazanski Vet.** **48**, 75, 1962.
- ACOSTA, J. **História Natural e Moral das Índias**; Madrid, p. 253, 1792.
- ADAMS, D. O. & HAMILTON, D. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, **2**, p. 283, 1984.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. Academic Press Inc. San Diego, p. 296, 1989.
- AHNFELT-RONNE, I.; NEILSON, O.H.; CHRISTENSEN, A.; LANGHOLZ, E.; BINDER, V.; RILIS, P. Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. **Gastroenterology**, **98**, 1162-1169, 1990.
- ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; JIMÉNEZ, M.; LA CASA, C.; LÓPEZ, A. Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. **Planta Med.**, **61**, 116-119, 1995.
- ALENCAR CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. **Phytother. Res.** **17**, 320-324, 2003.
- ALENCAR, J. C.; **Acta Amazonica** **11**, p. 3, 1981.
- ALENCAR, J. C.; **Acta Amazonica** **12**, p. 75, 1982.
- ALENCAR, J. C.; **Acta Amazonica** **14**, p. 255, 1984.
- ALVES, T.M.A.; CHAVES, P.P.G.; SANTOS, L.M.S.T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.F.; CERAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. **Planta Med.** **61**, p. 85, 1995.
- ANDRADE Jr., M.A.; FERRAZ, I.D.K.; VEIGA JR., V.F. **51º Congresso Nacional de Botânica da Sociedade Botânica do Brasil**, Brasília, Brasil, 2000.
- ANTHONY A.; POUNDER R. E.; DHILLON A. P.; *et al.*, Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. **Aliment Pharmacol Ther.** **14**, 241-5, 2000.

- Anuário Estatístico do Brasil**, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*; Rio de Janeiro, 1996.
- ARRHENIUS, S.P.; LANGENHEIM, J.H. **Phytochemistry** **22**, 471, 1983.
- ARRUDA, F.F.A. **O Brasil Colonial**; São Paulo, 1980.
- BAILLON, H. **Dictionnaire de botanique**, Tomo II; Hachette et Cie.: Paris, 1886.
- BAKER, S. & CAMPBELL, L. Enterocyte injury by oxygen-dependent processes. **Gastroenterology** **101**, 716-720, 1991
- BALOGH, N.; KRAUSZ, F.; LEVAI, P.; RIBICZEYNE, O.S.; VAJDOVICH, P.; GAAL, T. Effect of deferoxamine and L-arginine treatment on lipid peroxidation in an intestinal ischaemia-reperfusion model in rats. **Acta Vet. Hung** **50**, 343-356, 2002.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; BENATTI NETO, C.; LIA, R.C.C. **J. Bras. Clin. Estet. Odont.** **3**, 42, 1998.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; PIZZOLITTO, A.C.; BENATTI NETO, C.; JORGE NETO, J. **J. Bras. Clin. Estet. Odont.** **3**, p. 39, 1998.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; PIZZOLITTO, A.C.; BENATTI NETO, C. **J. Bras. Clin. Estet. Odont.** **3**, 47, 1998.
- BARBOSA, J.M.; AGUIAR, I.B.; SANTOS, S.R.G. **2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas**, Brasília, Brasil, 1992.
- BARLÉU, G. **História dos feitos recentemente praticados durante oito anos no Brasil**, vol. 15; Coleção Reconquista do Brasil; Ed. Itatiaia: Belo Horizonte, p. 141, 1974.
- BARNES P. J.; KARIN M.;. NF-kB- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl J. Med.** **336**, 1066-71, 1997.
- BARRIGA, H. G.; **Flora Medicinal de Colombia**. *Botanica Medica*; vol.3, Tercer Mundo Editores: Bogotá, p. 559, 1992.

- BARROS, M. A. G.; **Brasil Florestal** **12**, 35, 1982.
- BARTH, O. M.; **Rev. Brasil. Biol.** **31**, 431, 1971.
- BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C.; J. **Ethnopharmacol.**, **22**, 101, 1988.
- BEER, R. F., Jr.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem.** **195**, 133, 1952.
- BERSTEIN, C.N. & SHANAHAN, F. **Immunomodulatory therapy in inflammatory bowel disease**. In: Targan RS, Shanahan F. Eds. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore; Williams & Wilkins, 503-523, 1994.
- BERTONI, M. S.; **La Civilizacion Guarani**, Parte III, Imprenta Y Edicion "Ex-Sylvis"; Puerto Bertoni, p. 299, 1927.
- BETTARINI, F.; BORGONOV, G. E.; **Insect Sci. Applic.** **14**, 93, 1991.
- BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, **22**, 191-195, 1973.
- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamaórias intestinais: revisão. *Rev. Brass. Coloproct.* **23**(3), 172-182, 2003.
- BLAU S.; RUBISTEIN A.; BASS P.; SINGARAM C. H.; KOHEN R. Differences in the reducing power along the rat GI tract: lower antioxidant capacity of the colon. **Mol Cell Biochem.** **194**, 185-91, 1999.
- BLUMENSTEIN, B.J.; MA, C.K.; ZHANG, X.; HADZIJAHIC, N.; FOGEL, R. Orally administered oxygen radical scavenger (vitamin E) reduces mucosal damage in a rat model of inflammatory colitis. **Gastroenterology**, **106**, p. 1018, 1994.

- BOMBONATTI, P. E.; SCARANELO, R. M.; **Rev. Odontol. UNESP** **25**, 27, 1996.
- BOMPARD, P.; **Los Grandes Remedios Vegetales**; Editora Caymi: Buenos Aires, p. 171, 1964.
- BORGES, E. E. L.; BORGES, C. G.; **Rev. Bras. Sem.** **1**, 45, 1979.
- BORREGAARD, N.; JENSEN, H.S.; BJERRUW, O.W. Prevention of tissue damage: inhibition of myeloperoxidase mediated inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by N-acetyl cysteine, glutathione, and methionine. **Agents Action**, **22**, 255-260, 1987.
- BOYD, S. C.; SASAME, H. A.; BOYD, M. R. High concentration of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Sci.** **205**, 1010-1112, 1979.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, P.A.; CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G.R. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.** **78**, 206-9, 1982.
- BRAGA, R.; **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**; 3ª ed., Fortaleza, p. 401, 1960.
- BRAGA, W. F.; VEIGA JR., V. F.; PATITUCCI, M. L.; GARRIDO, F. M. S.; BERGTER, L.; ANTUNES, O. A. C.; PINTO, A. C.; **J. Braz. Chem. Soc.** **11**, 355, 2000.
- BRAGA, W.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- BRITO, M. V. H.; OLIVEIRA, R. V. B.; MORAIS, M. R.; LAMEIRA, O. A.; **Rev. Paraense Med.** **13**, 34, 1999.
- BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; GOMES, P. O.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F.; **Rev. Paraense Med.** **13**, 12, 1999.
- BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F.; **Rev. Paraense Med.** **12**, 28, 1998.

- BROSTRÖM, O.; LÖFBERG, R.; NORDENWALL, B.; ÖST, Å.; HELLERS, G. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: an epidemiological study. **Scand. J. Gastroenterol.** **22**, 1193-99, 1987.
- BRUNETON, J.; **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**; Lavoisier: Paris, 1987, p. 585.
- BRUNETON, J.; **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales**; Lavoisier: Paris, p. 915, 1993.
- BRYNSKOV, J. Cyclosporin for inflammatory bowel disease: mechanisms and possible actions. **Scand. J. Gastroenterol.** **28**, 849-57, 1993.
- BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G.; DIETRICH, S. M. C.; **Physiol. Plant.** **86**, 145, 1992.
- BUFFINTON, G.D. & DOE, W.F. Depleted mucosal antioxidant defenses in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 911-918, 1995.
- BULKLEY, G.B. Free radical – mediated reperfusion injury: a selective review. **Br. J. Cancer. Suppl.**, **8**, 66-73, 1987.
- BURKART, A.; **Las Leguminosas Argentinas**; Acme Agency: Buenos Aires, p. 15, 1943.
- BURNS J. L.; MANCOLL J. S.; PHILLIPS L. G. Impairments to wound healing. **Clin Plast Surg.** **30(1)**, 47-56, 2003.
- CALVIN, M.; **J. Chem. Educ.** **64**, 335, 1987.
- CALVIN, M.; **Naturwissenschaften** **67**, 525, 1980.
- CALVIN, M.; *Science* **1982**, *219*, 24.
- CARDIM, F.; **Do clima e Terra do Brasil**, 1584, p. 21, *apud* Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4^a ed.; Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 112, 1998.
- CARRARA Jr., E.; MEIRELLES, H.; **A Indústria Química e o Desenvolvimento do Brasil - 1500-1889**; Metalivros: São Paulo, p. 115, 1996.

- CARTY, E.; DE BRABANDER, M.; FEAKINS, R.M.; RAMPTON, D.S. Measurement of in vivo rectal mucosal cytokine and eicosanoid production in ulcerative colitis using filter paper. **Gut** **46**, 487-492, 2000.
- CARVALHO, J. B. M.; **O Norte e a indústria de óleos vegetais sob o aspecto técnico-econômico**; Ministério da Agricultura; Rio de Janeiro, p. 135, 1942.
- CARVALHO, P. E. R.; **Espécies florestais brasileiras; recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**; EMBRAPA/CNPQ: Brasília, p. 640, 1994.
- CASCON, V.; GILBERT, B.; ARAÚJO, G. L.; ROCHA, L. M.; TEIXEIRA, L. A.; CARVALHO, E.S.; **16º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, Brasil, 2000.
- CASTRILLO, A. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **J. Biol. Chem.** **276**, 15854-15860, 2001.
- CASTRILLO A.; DE LAS HERAS B.; HORTELANO S.; RODRIGUEZ B.; VILLAR A.; BOSCA I. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway of tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **J.. Biol Chem.** **276 (19)**, 15854-60, 2001.
- CAVALCANTE, P. B.; SALZANO, F. M.; BARROS, R. M.; AYRES, M.; **Bol. Mus. E. Goeldi**, Nova série, **36**, 1, 1970.
- CARTY, E., DE BRABANDER, M., FEAKINS, R.M., RAMPTON, D.S. Measurement of in vivo rectal mucosal cytokine and eicosanoid production in ulcerative colitis using filter paper. **Gut** **46**, 487-492, 2000.
- CESAR, G.; **Curiosidades da Nossa Flora**; Imprensa Oficial: Recife, p. 374, 1956.

- CHEN, B.W.; WANG, H.H.; LIU, J.X.; LIU, X.G. Zinc sulphate solution enema decreases inflammation in experimental colitis in rats. **J. Gastroenterol. Hepatol** **14**, 1088-1092, 1999.
- CHEN J.Y.; CHIU J.H.; CHEN H.L.; CHEN T.W.; YANG W.C.; YANG A.H. Human peritoneal mesothelial cells produce nitric oxide: induction by cytokines. **Perit Dial Int.** **20**(6), 772-7, 2000.
- CHEN L. W.; EGAN L.; LI Z. W.; GRETEN F. R.; KAGNOFF M. F.; KARIN M. The two faces of IKK and NF- κ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. **Nat Med.** **9** (5), 575-89, 2003.
- CHEN J.; WANG G. Role of nuclear factor kappaB in intestine injury induced by hepatic ischemia reperfusion. *J Huaxhong.* **Univ Sci Technolog Med Sci.** **24** (3), 284-5. 2004.
- COCKER, W.; MOORE, A. L.; PRAIT, A. C.; **Tetrahedron Lett.** **24**, 1983, 1965.
- COLPAERT S.; LIU Z.; DE GREEF B.; RUTZERTS P.; CEUPPENS J. L.; GEBOES K. Effects of anti-tumour necrosis factor, interleukin-10 and antibiotic therapy in the indomethacin-induced bowel inflammation rat model. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **15**, 1827-36, 2001.
- Comércio Exterior do Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**; 1962-1996, Rio de Janeiro, 1962-1996.
- COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; LIA, R. C. C.; GONZAGA, H. F. S.; VARGAS, P. A.; **REV. Fac. Odontol. Porto Alegre** **37**, 24, 1996.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A. PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of okraurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* óleo-resin. **Toxicon** **40**, 1231-1234, 2002.

- CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. J. W.; **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**, Ed. UFC, Fortaleza, p. 79. 1981.
- CRAVEIRO, A. A.; MAIA, J. G. S.; VAREJÃO, M. J. C.; FILHO, W. W.; MOURÃO, A. P.; ALENCAR, J. W.; **Acta Amazonica** **8**, 705, 1978.
- CRESTANA, C. M.; BELTRATI, C. M.; **Naturalia** **13**, 45, 1988.
- CRESTANA, C. S. M.; KAGEYAMA, P. Y.; **Rev. Inst. Flor.** **1**, 201. 1989.
- CRUZ, G. L.; **Livro Verde das Plantas Medicinais e Industriais do Brasil**, Belo Horizonte, p. 394, 1965.
- CUNHA, A. G.; **Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi**, 4ª ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 113, 1998.
- DALKARA, T. & MOSKOWITZ, M.A. Neurotoxic and neuroprotetive roles of nitric oxide in cerebral ischemia. **Int. Rer. Neurobiol.** **40**, 319-336,1997.
- DAMIÃO A.O.M.C. & HABR-GAMA A. Retocolite ulcerativa idiopática(RCUI).In: Dani R., Castro L.P. **Gastroenterologia Clínica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1037-69, 1993.
- DE ALENCAR CUNHA, K. M.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. N. S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, aditerpene from *Copaifera langsdorffi* on rat uterus in vitro. **Phytother. Res.** **17**, 320-324, 2003.
- DEL CASTILHO, M. I. C.; **Bras. PI BR 93** 01/950, 1993.
- DEL CASTILHO, M. I. C.; **Bras. PI BR 93** 02/002, 1993.
- DEL NUNZIO, M. J.; **Aerosol Cosmet.** **7**, 7, 1985.
- DELLE MONACHE, F.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; CORIO, E.; **Ann. Chim.**, **59**, 539, 1969.
- DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTÓLO, G. B. M.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DELLE MONACHE, M.; **Ann. Chim.** **60**, 235, 1970.

- DELLE MONACHE, G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTÓLO, G. B. M.; NANO, G. M.; **Tetrahedron Lett.** **8**, 659, 1971.
- DENYER, C. V.; JACKSON, P.; LOAKES, D. M.; ELLIS, M. R.; YOUND, D. A. B.; **J. Nat. Prod.** **57**, 658, 1992.
- DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G.; **Phytot. Res.** **11**, 460, 1997.
- DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G.; **Intern. J. Pharmacog.** **35**, 288, 1997.
- DEUSSEN, E.; **Chem. Ztg.** **36**, 561, 1912.
- DEUSSEN, E.; **Scientia Pharm.** **10**, 69, 1939.
- DI BIRETTI, M. S.; VIDAL, E. M.; BALDOVINO, M. C., BENESOVSKY, V.; **Am. J. Primatol.** **50**, 257, 2000.
- DOHERTY, D. E. *et al.* Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. **J. Immunol.**, **138**, p. 762, 1987.
- DUCHESNE, E. A.; Répertoire des Plantes Utiles et des Plantes Vénéneuses du Globe; **J. Renouard** ed.: Paris, p. 572, 1836.
- DUCKE, A.; **An. Acad. Brasil. Ciências**, **30**, 327, 1967.
- DUCKE, A.; **As Leguminosas da Amazônia Brasileira**; Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, p. 56, 1939.
- DUCKE, A.; **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, **18**, 81, 1949.
- DUCKE, A.; **Revue Bot. Appl.** **12**, 30, 1932.
- DUKE, J. A.; **Aloe Research Council**, em USDA; Phytochemical Database.
- DWYER, J. D.; **Brittonia**, **7**, 143. 1951.
- DWYER, J. D.; **Bull. Torrey Bot. Club**, **81**, 179, 1954.

DWYER, J. D.; **Tropical Woods**, **83**, 15, 1945.

EDWARDS, S.W.; HUGHES, V.; BARLOW, J.; BUCKNALL, R. Immunological detection of MPO in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Biochem. J.** **250(1)**, 81-5, 1988.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; MELLO, C. M. C.; TANAKA, D. M.; 2º **Congresso Nacional sobre Essências Nativas**, Brasília, Brasil, 1992.

EKBOM, A.; HELMICK, C.; ZACK, M.; ADAMI, H.O. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. **N. Engl. J. Med.** **323**, 1228-33, 1990.

ERDEN, M. & BOR, N.M. Changes of reduced glutathion reductase, and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. **Biochem. Med.**, **31**, 217-227, 1984.

ESMON, C. T. Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. **Annu. Rev. Cell Biol.**, **9**, 1993.

FABIA, R.; AR'RAJAB, A.; WILLÉN, R. Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylinositol on acetic-acid-induced colitis in the rat. **Digestion** **53**, 35-44, 1992.

FABIA, R.; AR'RAJAB, A.; WILLÉN, R.; ANDERSSON, R.; BENGMARK, S. Effect of putative phospholipase A2 inhibitors on acetic acid-induced acute colitis in the rat. **Br. J. Surg.** **80**, 1199-1204, 1993.

FEDORAK, R.N.; EMPEY, L.R.; MACARTHUR, C.; JEWELL, L.D. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. **Gastroenterology** **98**, 615-25, 1990.

FERGUSON, A.; SEDGWICK, D.M.; DRUMMOND, J. Morbidity of juvenile onset inflammatory bowel disease: effects on education and employment in early adult life. **Gut** **35**, 665-68, 1994.

FERGUSON M.W.; O'KANE S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B.* **Biol Sci.** **359(1445)**, 839-50, 2004.

- FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L. G.; Anti-inflammatory of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Rev. Bras. Farm.** **73**, 53, 1992.
- FERRARI, M.; PAGNONI, U.M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G.; **Phytochemistry** **10**, 905, 1971.
- FERREIRA, M. B.; **Informe Agropecuário**, **61**, 19, 1980.
- FERREIRA, M. C.; **Mémoire de D. E. S. U.**; Paris VI, p. 79, 1992.
- FICALHO, *Apoth. Ztg.* **1904**, 86, *apud* Die Pflanzenstoffe, G. Fisher, J.; vol I, p. 499, 1929.
- FIGUEIREDO, E. R.; **Chácaras e Quintaes** **52**, 82, 1935.
- FIGUEIREDO, N.; **Rezadores, Pajés e Puçangas**; Ed. Boitempo: Belém, p. 96, 1979.
- FLEURY, M.; **Acta Bot. Gallica** **144**, 473, 1997.
- FONSECA, E. T.; **Óleos vegetais brasileiros**; 2ª. ed., Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, p. 152, 1927.
- FONSECA, E. T.; **Revista da Flora Medicinal** **6**, 161, 1939.
- Food Chemical Codex**, 2nd ed., Washington: DC, p 218, 1972.
- FRANCESHINI, C. A.; **Comunicação pessoal**.
- FRANCO, T.T.; RODRIGUES, N.R.; SERRA, G. E.; PANEGASSI, V. R.; BUCKERIDGE, M. S.; **J. Chromatogr., B**, 680, 255, 1996.
- FREISE, F. W.; **Süddeut. Apot-Ztg.** **77**, 11, 1937.
- FREISE, W.; **Boletim de Agricultura** **34**, 326, 1933.
- FRIES W.; MAZZON E.; SQUARZONI S.; MARTIN A.; MARTINES D.; MICALI A.; STURNIOLO G.C.; CITI S.; LONGO G. Experimental colitis increases small intestine permeability in the rat. **Lab Invest.** **79 (1)**, 49-57, 1999.

- FUCHS, F.D. & WANNMACHER, L. **Meto dos de investigação farmacológico-clínica.** in: Fuchs FD & Wannmacher Eds. *Farmacologia Clínica*. 2ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan SA, 7-16, 1998.
- GÂNDAVO, P. M.; **História da Província de Santa Cruz a que Vulgarmente Chamamos Brasil;** Oficina Antônio Gonsalves: Lisboa, p. 18, 1576.
- GARCIA RODRIGUEZ L.A. & JICK H. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet** **343**, 56-57, 1994.
- GARDÈS-ALBERT, M.; SESAKI, A.; FERRADINI, C.; DROY-LEFAIX, M.T. EGb 761 scavenger effect against OH and O₂ free radicals. A gamma radiolysis study. **Free Radical Biol. Med.**, **9**, 190, 1990.
- GHOSH S.; KARIN M. Missing pieces in the NF-kB puzzle. **Cell**. **109**, S81-S96, 2002.
- GIANG P. M.; JIN H. Z.; SON P. T.; LEE J. H.; HONG Y. S.; LEE J. J. Ent-kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production. **J Nat Prod**. **66 (9)**, 1217-20, 2003.
- GILBERT, B.; **Chemistry of the Amazon**, American Chemical Society: New York, cap III, 1995.
- GILBERT, B.; MORS, W. B.; BAKER, P. M.; TOMASSINI, T. C.; PELLEGRINO, J.; **An. Acad. Bras. Ciências** **44**, 423, 1972.
- GILDEHEISTER, E.; HOFFMAN, F.; **Die Atherische Öle** **V**, 305, 1935.
- GILLIS, C.N. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link?. **Biochem. Pharmacol.**, **54**, 1-8, 1997.
- GONZALEZ DE MEJIA, E.; QUINTANAR-HERNANDEZ, A.; LOARCA-PINA, G. Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. **Mutat. Res.** **416**, 11-19, 1998.

- GOODMAN, L.; GILMAN, A.; **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; vol. 2, Ed. Guanabara: Rio de Janeiro, p. 1461, 1945.
- GOTTLIEB, O. R.; IACHAN, A.; **Rev. Quim. Ind.** **14**, 420, 1945.
- Grande Enciclopédia Larrousse Cultural**, p. 1608, 1998.
- GRENAND, P.; MORETTI, C.; **Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles, Palikur, Wayãpi.**; Orstom: Paris, p. 569, 1987.
- GRIEB, P. Antioxidant systems-physiology and pharmacotherapy trends. **Materia Medica Polona**, **84**, 217-222, 1992.
- GRIEVE, M.; **A modern herbal**; Tiger Books International: London, p. 221, 1994.
- GRINNELL, F. Fibronectin and wound healing. *J. Cell. Biochem.*, **25**, p.107, 1984.
- GRISHAM M. B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **Lancet**. **344**, 859-61, 1994.
- GRISHAM M.B.; GRANGER D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury: role of reactive oxygen metabolites. **Dig Dis Sci**. **33**, 6S-15S, 1988.
- GRISHAM, M.B.; HERNANDEZ, L.A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. **Am. J. Physiol.** **251**, G567-G574, 1986.
- GRISHAM, M.B.; MACDERMOTT, R.P.; DEITCH, E.A. Oxidant defense mechanisms in the human colon. **Inflammation**, **14**, 669-680, 1990.
- GRISHAM, M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **The Lancet**, **344**, 859-861, 1994.
- GUILLEN, J. L.; **Simposio Internazionale Sulla Medicina Indigena e Popolari Dell America Latina**; Roma, Itália, 1977.
- GUILLON, J.M.; ROCHETTE, L.; BARANES, J. Effects de l`extrait de *Ginkgo biloba* sur 2 modèles d`ischémic myocardique expérimentale. **La Presse Médicale**, **15**, 1516-1519, 1986.

- HALLIWELL B. Free radicals and antioxidant protection mechanisms and significance in toxicology and disease. **Human Toxicol.**, **7**, 7-13, 1988.
- HALLIWELL B. & GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys**, **280**, 1-8, 1990.
- HALLIWELL B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Rad. Res. Commun.**, **9**, 1-32, 1990.
- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; **Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**; Taylor & Frost: London, p. 791, 1983.
- HARBORNE, J.B.; BOULTER, D.; TURNER, B.L.; **Chemotaxonomy of the Leguminosae**; Academic Press: London, p. 1, 1971.
- HARRIS, M.; SCHILLER, H.; REILLY, P.; DONOWITZ, M.; GRISMAN, M.; BULKLEY, G. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon?. **Pharmac. Ther.**, **53**, 375-408, 1992.
- HARTWELL, J.L.; **Lloydia** 30, 1967.
- HAY, J.W. & HAY, A.R. Inflammatory Bowel Disease: costs-of-illness. **J. Clin. Gastroenterol.** **14**, 309-17, 1992.
- HAYNE; **Arzneig**, 10, 16, 1825.
- HOENE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O.; **O Jardim Botânico de São Paulo**; Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 643, 1941.
- HOLLANDER, D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. **Scand J. Gastroenterol.** **27**, 721-726, 1992.
- HODGSON, H.J. The natural history of treated ulcerative colitis [editorial; comment]. **Gastroenterology** **107**, 300-2, 1994.

- HOULI, J. & NETTO, G.M. Retocolite ulcerativa inespecífica. **Rev. Bras. Coloproct.** **4**, 191-205, 1984.
- HUBNER, G. & GRISELDI, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, **8**, p. 548, 1996.
- HYNES, R. O. Fibronectins. **Sci. Am.**, **254**, p. 42, 1986.
- IMAMURA, P. M. **Organic Synthesis in Brazil: A Overview**, Ed. USP: São Paulo, p. 62, 1992.
- Index Kewensis**, suppl. XX; Claredon Press: Oxford, 1996.
- JACOBSON, M.; **Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents**; CRC Press: Boca Raton, p. 213, 1990.
- JACQUIN; **Enum. Pl. Carib.** **65**, 1760.
- JOHNSON, R.; COUSER, W.G.; CHI, E.Y.; ADLER, S.; KLEBANOFF, S.J. New mechanism for glomerular injury. **J. Clin. Invest.** **79(5)**, 1379-87, 1987.
- JONES, S. C.; CARTER, F. L.; MAULDIN, J. K.; **Env. Entomol.** **12**, 458, 1983.
- JOSEPH, P.; SIRINIVASAN, N.S.; KULKAMI, A.P. Placental peroxidase further purification of the enzyme and oxidation of thiobenzamide. **Placenta** **14(3)**, 309-19, 1993.
- JUDD, S. W.; CAMPBELL, S. C.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. S.; **Plant Systematics**, A Phylogenetic Approach; Ed. Sinauer: Sunderland, p. 283, 1999.
- JUNGER, W.G.; CARDOZA, T.A.; LIU, F.C. HOYT, D.B.; GOODWIN R. Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. **J. Immunol. Methods**, **160**, 73-9, 1993.
- KANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M. J.; JABER, H.; NAKATSU, T.; **J. Agric. Food Chem.** **40**, 2328, 1992.

- KARGER, S.; CAMPO, G.M.; SQUADRITO, F.; LOCULANO, M.; ALTAVILLA, D.; ZINGARELLI, B. Protective effects of IRFI-016, a new antioxidant agent in myocardial damage, following coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. **Pharmacology**, **48**, 157-66, 1994.
- KEELER, R. F.; TU, A. T.; Toxicological of Plant and Fungal Compounds; **Handbook of Natural Toxins**, vol. 6, Marcel, Dekker, ed.; Nova York, p. 665, 1991.
- KESHAR, S. & STEIN, W. The versatily of macrophages (review). **Clin. Exp. Allergy**, **22**, p. 19, 1992.
- KESHAVARZIAN, A.; MORGAN, G.; SEDGHI, S.; GORDON, J.H.; DORIA, M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. **Gut**, **31**, 786-790, 1990.
- KESHAVARZIAN, A.; SEDGHI, S.; KANOFISKY, J.; LIST, T.; ROBINSON, C.; IBRAHIM, C.; WINSHIP, D. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. **Gastroenterology**, **103**, 177-185, 1992a.
- KESHAVARZIAN, A.; HAYDEK, J.; ZABIHI, R.; DORIA, M.; DÀSTICE, M.; SORENSON, J.R.J. Agents capable of eliminating reactive oxygen species: catalase, WR-2721, or Cu(II)₂(3,5-DIPS)₄ decrease experimental colitis. **Dig. Dis. Sci.**, **37**, 1866-1873, 1992b.
- KETTLE, A.J.; ROBERTSON, I.G.G.; PALMER, B.D.; ANDERSON, R.F.; PATEL, K.B., WINTERBOURN, C.C. Oxidative metabolism of amsacrine by the neutrophyl enzyme myeloperoxidase. **Biochem. Pharmacol.** **44(9)**, 1731-8, 1992.
- KETTLE, A.J. & WINTERBOURN, C.C. Assays for the chlorination activity of mieloperoxidase. **Methods in enzymology**, **233**, 502-12, 1994.
- KETTLE, A.J.; GEDYE, C.A.; WINTERBOURN, C.C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrochloride. **Biochem. J.** **321**, 503-508, 1997
- KLIGMAN, A. M.; **J. Invest. Derm.** **47**, 393, 1966.

- KIMURA, T.; ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; SAOTOME, T.; BAMBA, T. A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischaemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. **Clinical and Experimental Immunology** 111, 3 p. 484, 1998.
- KOMATSU, H.; GHADISHAH, E.; ZENG, H.; KUHLENKAMP, J.F.; INOVA, M. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. **Am. J. physiol.** 262(4pt 1), 6669-76, 1992.
- KOO, A.; KOMATSU, H.; TOO, G.; INOVE, M.; GUTH, P.H.; KAPLOWITZ, N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide union. **Hepatology**, 15, 507-514, 1991.
- KRAWISZ, J.E, SHARON, P., STENSON, W F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology** 87, 1344-1350, 1984.
- KRUIDENIER, L. & VERSPAGET, H. W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators of Inflammation** 7, 157-162, 1998.
- KUBO, I.; MUROI, H.; **J. Agric. Food Chem.** 41, 1102, 1993.
- KULMACZ R.J. & LANDS W.E. Stoichiometry and kinetics of the interaction of prostaglandin H synthase with anti-inflammatory agents. **J Biol Chem** 260, 12572-12578, 1985.
- KVIETZ, P., TWOHIG, B., DANZELL, J., SPECIAN, R. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. **Gastroenterology** 98, 909-920, 1990.
- LACEY, L.A.; SCHRECK, C.E.; MCGOVERN, T.P.; **Mosquito News** 41, 376, 1981.
- LALANI, T.L.; BHOL, K.; KAHN, I.U.; AHMED, A.R.; The scarring processes in mucosal tissues after immune injury. **Semin Arthritis and Rheum.** 27 (6), 371-81, 1998.

- LANGE, S.; DELBRO, D.S.; JENNISCHE, E. Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat. **Scand. J. Gastroenterol.** **29**, 38-46, 1994.
- LANGE, S. & DELBRO, D.S. Adrenoceptor-mediated modulation of Evans blue dye permeation of rat small intestine. **Digestive Diseases and Sciences** **40**, 2623-2629, 1995.
- LANGENHEIM, J. H.; **Am. Sci.** **78**, 16, 1990.
- LANGENHEIM, J. H.; FIGLIUOLO, R.; NAYLOR, S.; WANG, J.; **Phytochemistry**, **26**, 3255, 1987.
- LANGGAARD, T. J. H.; **Novo Formulário Médico e Farmacêutico**; Ed. Laemmert: Rio de Janeiro, p. 1220, 1872.
- LAUDANNO, O.M.; PIOMBO G.; CESOLARI, J.A.; GODOY A.; ROCASPANA A.; ARAMB L. Dexketoprofene, selective COX-1 inhibitor NSAIDs, without gastrointestinal injury in rats. **Acta Gastroenterol Latinoam**, 2002.
- LAUREN, L.; NAESDAL, J.; BUKHAVE, K.; LAURITSEN, K.; RASKMADSEN, J. Selective 5-lipoxygenase inhibition in ulcerative colitis. **Lancet**, **335**, 683-685, 1990.
- LAWRENCE, B. M.; **Progress in essential oil. Natural Flavor and Fragrance Materials** **5**, 32, 1980.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLOGHBY, D.A. Possible new role for NF-kB in the resolution of inflammation. **Nat Med.** **7**, 1291-7, 2001.
- LAWRENCE, W.T.; Physiology of the acute wound. **Clinics in Plastic Surgery**, **25(3)**, 321-340, 1998.
- LE COINTE, P.; **L'Amazonie brésilien. Le pays, ses habitants, ses ressources**; vol.2; Paris, p. 493, 1922.
- LE COINTE, P.; **Notes sur les Graines Oléagineuses, les Baumes et les Résines de la Forêt Amazonnienne**; Paris, p. 28, 1927.

- LE COINTE, P.; **Apontamentos sobre as sementes oleaginosas**; Museu Comercial do Pará, 3a. ed., Belém, p. 47, 1927.
- LEEWENBERG, A. J. M.; **Medicinal and Poisonous Plants of the Tropics**, Ed. Pudoc: Wageningen, 1987.
- LEITE, A. C. P.; **Dissertação de Mestrado**; Universidade Federal do Acre, Brasil, 1997.
- LEITE, A. M. C.; LLERAS, E.; **Acta Bot. Bras.** **7**, 61, 1993.
- LENNARD-JONES, J.E.; MELVILLE, D.M.; MORSON, B.C.; RITCHIE, J.K.; WILLIAMS C.B. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. **Gut** **31**, 800-06, 1990.
- LÉRY, J., **Histoire d'un voyage fait en la terre du Brésil-1557**; Lestringant, F., ed.; Max Chaleil: Paris, 1578, p 263, re-ed. 1992.
- LEWIS, W H.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; **Medical Botany**; John Wiley and Sons: New York, p. 293, 1977.
- LIMA, L.S.; TORKASKY, R.M.; PSCIOTTANO, N.C.; SANTOS, A.M.; SCHUMACKER, I.E.; **Cosmet. Toil.** **7**, 39, 1995.
- LIMA, S.R.; JUNIOR, V.F.; CRISTO, H.B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother. Res.** **17(9)**, 1048-53, 2003.
- LIMA, S.R.M.; VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; **16º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, Brasil, 2000.
- LINNAEUS; **Sp. Pl.** 557, 1762.
- LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZCCA BLANCO, C.V. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Dig. Dis. Sci.** **41**, 1204-1211, 1996.

- LOUREIRO, A.A.; **Essências madeiras da Amazônia**, vol. 1; INPA/CNPq: Manaus, p. 125, 1979.
- MACPHERSON, B.R. & PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion** **17**, 135-170, 1978.
- MADARA, J.L. Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated? **Cell** **5**, 497-498, 1988.
- MADARA, J.L. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. **Am. J. Pathol**, **7**, 1273-1281, 1990.
- MADARA, J.L. Sodium-glucose cotransport and epithelial permeability. **Gastroenterology** **107**, p. 319, 1994.
- MAGALHÃES A.F.N. Doença de Crohn(CH). In: **Gastroenterologia Clínica**. Dani R, Castro L de P. Rio de Janeiro.Guanabara Koogan, 765-76, 1993.
- MAHAJAN, J. R.; FERREIRA, G. A. L.; **An. Acad. Brasil. Ciências** **43**, 611, 1971.
- MAHAJAN, J. R.; FERREIRA, G. A. L.; PELLEGRINO, J.; **An. Acad. Brasil. Ciências** **44**, 429, 1972.
- MALLART-GUIMERA, L.; **Le thème de l'arbre dans les contes africains**; Selaf 16, Paris, 1969.
- MALY, P.E. & SHURER-MALY, C.C. How and why cells make superoxide: the phagocytes NADPH oxidase, **NIPS** **10**, 233-238, 1995.
- MANFRED, L.; **Seiscientas Plantas Medicinales Argentinas y Sudamericanas**; 2ª ed.; Rosario, p. 503, 1940.
- MARCGRAVE, J.; **Historia Natural do Brasil**, Imprensa Oficial do Estado; São Paulo, p. 130, 1942.
- MÁRQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B.; WART, H.V. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. **J. Biol. Chem.** **265(10)**, 5666-70, 1990.
- MARUSSELLA, J. C.; SICURELLA, N. A.; **J. Am. Pharm. Assoc.** **49**, 692, 1960.

- MASCOLO, N., IZZO, A., AUTORE, G., MAIELLO, F., DI CARLO, G., CAPASSO, F. Acetic acid-induced colitis in normal and essential fatty acid deficient rats. **Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **272**, 469-475, 1995.
- MASSCHELEIN-KLEINER, L.; **Ancient binding media, varnishes and adhesives**; ICCROM: Rome, p. 75, 1995.
- MATOS, F. J. A.; **O Formulário Fitoterápico do Professor Dias da Rocha**, 2^a ed.; Edições UFC: Fortaleza, p. 113, 1997.
- MATSUMOTO, T., MORIGUCHI, R., YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **J. Pharm. Pharmacol** **45**, 535-539, 1993.
- MATSUMOTO S.; WATANABE N.; IMAOKA A.; OKABE Y. Preventive effects of bifidobacterium- and lactobacillus- fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. **Digestion** **64**, 92-9, 2001.
- MATTA, A. A.; **Flora Medica Braziliense**; Imprensa Oficial: Manaus, p. 318, 1913.
- MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPINOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS, S.B. Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, **60**, 111-116, 1998.
- MATTOS FILHO, A.; RIZZINI, C. T.; MAUTONE, L.; GUIMARÃES, E. F.; **Árvores do Jardim Botânico**; Ed. Lidador: Rio de Janeiro, p. 67, 1993.
- MAUGH, T.H.; **Science** **206**, 436, 1979.
- MAXIMILIANO; **Viagem ao Brasil**; Companhia Editora Nacional; 2^a ed., São Paulo, p. 536, 1958.
- MCCARTHY, R. D.; DUTHIE, A. H.; **J. Lip. Res.** **3**, 117, 1962.

MEDEIROS, D. F.; XAVIER FILHO, L.; BARBOSA FILHO, J. M.; **Bol. Soc. Brot.; Sér. 2, 58, 43, 1985.**

MENCONI, D.; ROCHA, L. Riqueza Ameaçada, **Isto é 1773**, 92-98, 2003.

Merck Index; 11th ed.

MEYER, F.; MEYER, E.; **Arzneimittel-Forsch 9**, 516, **1959**.

MIDDLETON, S.J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J.O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, **341**, 465-466, 1993.

MING, L. C.; **Dissertação de Doutorado**; Universidade Estadual Paulista, Brasil, 1995.

MILLER, T.A.; LID, K.; KUO, Y.J. Nonprotein sulfydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE and ethanol. **Am. J. Physiol.** **12**, 137-144, 1985.

MIRANDA, R. C. M.; WANDERLEY, T. K. V.; MOURA, W.; ARAÚJO, J.; **16º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, Brasil, 2000.

MIRANDOLA FILHO, A.; MIRANDOLA, N. S. A.; **Vegetais Tintoriais do Brasil Central**; Ed. Líder: Goiânia, p. 143, 1991.

MONCADA, S. & HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329, 2002-2012, 1993.

MORÃO, S. P.; **Queixas de Pernambuco**, 1677, em: Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4^a ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 113, 1998.

MORIN, P.H.; PICHARD, H.; RICHARD, H.; CAUDE, M.; ROSSET. **J. Chromatogr.** **464**, 125, 1989.

MORRIS, G. P.; BECK, P. L.; HENIDGE, M. S.; DEPEW, W. T. SZEWZCUK, M. R., WALLACE, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology** **96**, 795-803, 1989.

MORS, W. B.; MONTEIRO, H. J.; **An. Assoc. Bras. Quím.** **18**, 181, **1959**.

- MORS, W.; RIZZINI, C. T.; **Useful Plants of Brazil**; Holden-Day Inc.: San Francisco, p. 45, 1966.
- MORTON, J. J. P. & MALON, M. H. Evaluation of vulnery activity by an open wound procedure in rats. *Arch Int. Pharmacodyn.*, **196**, 117-126, 1972.
- MULDER, T.P.J.; VERSPAGET, H.W.; JANSSENS, A.R.; DE BRUIN, P.A.F.; PENA, A.S.; LAMERS, C.B.H.W. Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut*, **32**, 1146-1150, 1991.
- NAGI, E. & ZINGG, W. Simple standardized method for studying the tensile strength of healing incisions in animals. *Canad. J. Surg.*, **14**, 136-140, 1971.
- NAITO Y.; YOSHIKAWA T.; YOSHIDA N.; KONDO M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci.* **43 (9 Suppl)**, 30S-34S, 1998.
- NAITO, Y.; TAKAGI, T.; ICHIKAWA, H.; TOMATSURI, N.; KURODA, M.; ISOZAKI, Y.; KAT, K.; UCHIYAMA, K.; KOKURA, S.; YOSHIDA, N.; OKANAQUE, T.; YOSHIKAWA, T.A. Novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Nitric oxide*. **10 (3)**, 170-7, 2004.
- NALINI S.; MATHAN, M.M.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemis/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Mol. Cell. Biochem.* **124(1)**, 59-66, 1993.
- NATTAYA, N. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by (-)-ent-kaur-16-en-19-oic acid and its derivatives. *Planta Med.* **69**, 555-556, 2003.
- NATURA. **Flora Medicinal, Uma História Singular**. 1ª Edição, São Paulo, 2002.
- NEURATH, M.; FUSS, I.; STROBER, W. TNBS-colitis. *Intern Rev Immunol.* **19 (1)**, 51-62, 2000.

- NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, **156**, p. 430, 1982.
- NIGAN, I.; LEVI, L.; **J. Chromatogr.** **23**, 217, 1966. pg
- NICHOLS, T.C. NF-kappaB and reperfusion injury. **Drugs News Perspect.** **17 (2)**, 99-104, 2004.
- NOA, M.; MÁ, R.; CARBAJAL, D.; VALDÉS, S. Effect of D-002 on acetic acid-induced colitis in rats at single and repeated doses. **Pharmacological Research** **41**, 391-395, 2000.
- NOSÁLOVA, V.; CERNA, S.; BAUER, V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. **Gen Pharmacol.** **35**, 77-81, 2000.
- NYGARD, G.; ANTHONY, A.; PIASECKI, C., TREVETHICK, M.; HUDSON, M.; DHILLON, A.; POUNDER, R.; WAKEFIELD, A. Acute indomethacin-induced jejunal injury in the rat. Early morphological and biochemical changes. **Gastroenterology** **106**, 567-575, 1994.
- NYLANDER, O.; HALLGREN, A.; SABABI, M. COX inhibition excites enteric nerves that affect motility, alkaline secretion, and permeability in rat duodenum. **Am. J. Physiol. Liver Physiol.** **281 (5)**, G1169-78. 2001.
- O Tupi na Geografia Nacional**; 3ª ed., Bahia, p. 190, 1928.
- OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.** **4**, 2889, 1994.
- OLDENBERG, W.A.; LAU L.L.; RODENBERG, T.J.; EDMONDS, H. J.; BURGER C.D. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med.* 164 (10): 1054-62. Parks DA. 1989. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. **Gut.** **30**, 293-8, 2004.
- OLIVEIRA, F. M. M.; **Estudos de Matéria Médica Vegetal**; Escola Typographica Salesiana: São Paulo, p. 114, 1905.

- OLIVEIRA, L. M. Q.; **Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**; Cuiabá, Brasil, 1995.
- OPDYKE, D. L.; **Food Cosmet. Toxicol.** **14**, 687, 1976.
- OSHITANI, N.; KITANO, A.; OKABE, H.; NAKAMURA, S.; MATUMOTO, T.; KOBAYASHI, K. Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy. **Gut**, **34**, 936-938, 1993.
- OVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYILMAZ, E.; ERSOY, F.; ERATALAY, K. Mieoloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.** **35(4)**, 235-40, 1993.
- PAIVA, L. A. F.; ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytother. Res.** **16**, 737-739. 2002.
- PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.** **62**, 73-78, 1998.
- PAPPENHEIMER, J.R.; DAHL, C.E.; KARNOVSKY, M.L., MAGGIO, J.E. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**, 1942-1945, 1994.
- PARMAR, N.S.; TARIA, M.; AGEEL, A.M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of selenium in rats. **Tox. App. Pharmacol.** **91**, 12-130, 1988.
- PEAKMAN, M. & VERGANI, D. **Terapias de Base Imunológica**. In:_____. Imunologia básica e clínica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 292-303, 1999.
- PECKOLT, G.; **Revista Flora Medicinal** **9**, 453, 1942.

- PEETERS, M.; GHOOS, Y.; MAES, B.; HIELE, M.; GEBOES, K.; VANTRAPPEN, G.; RUTGEERTS, P. Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 39, 2170-2176, 1994.
- PEI-GEN, X.; NAI-GONG, W.; **J. Ethnopharmacol.** 32, 167, 1991.
- PENNA, M.; **Dicionário Brasileiro de Plantas Medicinais**, 3ª ed.; Liv. Kosmos: Rio de Janeiro, p. 409, 1946.
- PERALTA, J.G.; LLESUY, S.; EVELSON, P.; CARRERAS, M.C.; FLECHA, B.G.; PONDEROSO, J.J. Oxidative stress in skeletal muscle during sepsis in rats. **Circ. Shock**, 39(2), 153-9, 1993.
- PERROT, E.; **Matieres premieres usuelles de rezime végétal**; vol. 2; Masson & Cia: Paris, p. 1458, 1943.
- PERROT, E.; **Matières premières usuelles du Règne végétal**; Tomo II, Masson et Cie. Éditeurs: Paris, p. 2344, 1994.
- PINCEMAIL, J. & DEBY, C. Propriétés antiradicalaires de l'extrait de Gingko biloba. **La Presse Médicale**, 15, 1475-1479, 1986.
- PINCZOWSKI, D.; EKBOM, A.; BARON, J.; YUEN, J.E.T.; ADAMI, H.O. Risk Factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case control study. **Gastroenterology** 107, 117-20, 1994.
- PINHEIRO, J. T.; **Dissertação de Doutorado**, FUP, Camarajibe, Brasil, 1993.
- PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. D.; **Phytochem. Anal.** 8, 14, 1997.
- PIO CORRÊA, M.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**; Ministério da Agricultura; Rio de Janeiro, p. 370, 1931.
- PISO, G.; **Historia Natural e Médica da Índia Ocidental**; MEC: Rio de Janeiro, p. 270, 1957.
- PISO, G.; MARCGRAVE, J.; **Hist. Pl.** 3, 130, 1625.

- POWELL, D.W. Barrier function of epithelia. **Am. J. Physiol.** **241**,275-288, 1981.
- PRASAD, K.; LAXDAL, V.A.; YU, M.; RANEY, B.L. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. **Mol. Cell. Biochem.**, **19**, 183-189, 1995.
- RACHMILEWITZ, D., SIMON, P. L., SCHWARTZ, L. W., GRISWALD, D. E., FONDACARO, J. D., WASSERMAN, M. A. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology** **97**, 326-327, 1989.
- RAMASWAMI, S. K.; **Proceedings of the 10th. Intern. Congr. of Essencial Oils**, Washington, USA, p. 951, 1986.
- RAMIJAK, Z.; SOLC, A.; ARPINO, P.; SCHMITTER, J. M.; GUIOCHON, G.; **Anal. Chem.** **49**, 1222, 1977.
- RAMIREZ, N.; ARROYO, M. K.; **Biotropica** **22**, 124, 1990.
- REDD M. J.; COOPER L.; WOOD W.; STRAMER B.; MARTIN P. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol Sci.* **359(1445)**, 777-84, 2004.
- RIBEIRO, L.; **Medicina no Brasil colonial**; Rio de Janeiro, p. 211, 1971.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E.; **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**; Williams & Wilkins: Baltimore, p. 100, 1996.
- RODRIGUES, J. B.; **Hortus Fluminensis**; Rio de Janeiro, p. 307, 1894.
- RODRIGUES, J.; **Relação = A Missão Carijó**, *apud* Leite, S.; *Novas Cartas Jesuíticas*, 1607, *apud* Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4ª ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 112, 1998.
- RODRIGUES, L.; **Anchieta e a medicina**; Edições Apollo: Belo Horizonte, p. 361, 1934.
- RODRIGUES, P.; MACHADO, G.; **Simposio Internazionale Salla Medicina Indigena e Popolari Dell America Latina**; Roma, Itália, 1977.

- RODRIGUES, R. M.; **A flora da Amazônia**, Ed. Cejup: Belém, p. 463, 1989.
- ROSA, J. F.; **Tratado Único da Constituição Pestilencial de Pernambuco**; Lisboa, p. 37, 1694.
- ROSSELLS, B.; **Simposio Internazionale Salla Medicina Indigena e Popolari Dell America Latina**; Roma, Itália, 1977.
- RUH J.; SCHMIDT E.; GEBHARD M.M.; KLAR E.; GLASER F.; HERFARTH C. Effect of mast cell activation on microcirculation of intestinal mucosa in inflamed small intestine of the rat. **Langenbecks Arch. Chir. Suppl.I Kongressbd 115** (Suppl I), 109-12, 1998.
- SADOWSKI, D.C. & MEDDINGS, J.B. Luminal nutrients alter tight-junction permeability in the rat jejunum: na in vivo perfusion model. **Can. J. Physiol. Pharmacol. 71**, 835-839, 1993.
- SALIM, A. S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119, 710-717, 1992.
- SALVADOR, V.; **História do Brasil: 1500-1627**, 6^a. ed.; Melhoramentos: São Paulo, p. 65, 1975.
- SAMDANI, A.F.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**, **28**, 1283-1288, 1997.
- SÁNCHEZ DE MEINA, F.; VERA B.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sci. 70**, 3097-108, 2002.
- SANTARO, S. A. Identification of a 160.000 dalton platelet cation-dependent adhesion of platelets to collagen. **Cell.**, **913**, 1986.
- SANTOS, N.; **Rodriguesia**, **31**, 223, 1979.
- SARTOR, R.B. Cytokines in intestinal inflammation. Pathophysiology and clinical considerations. **Gastroenterology**, **106**, 533-539, 1994.

- SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F.; **The Healing forest. Medicinal and toxic plants of the North West Amazonia**; vol. 2; New York, p. 484, 1990.
- SCHWARZ, B.; SALAK, N.; HOFSTOTTER, H.; PAJIK, W.; KNOTZER, H.; MAYR, A.; HASBEDR, W. Intestinal ischemic reperfusion syndrome: pathophysiology, clinical significance, therapy. **Wien Klin Wochenschr** **111**, 539-548, 1999.
- SEO, H.G.; TAKATA, L.; NAKAMURA, M.; TATSUMI, H.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. *Arch Biochem Biophys* **324**, 41-47, 1995.
- SHARON, P., STENSON, W. F. Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats: similarity to human inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** **88**, 55-63, 1985.
- SHIMIZU, M.; SHOGAWA, H.; MATSUZAWA, T.; YONEZAWAS, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N.; **Chem. Pharm. Bull.** **38**, 2283, 1990.
- SIERRA, G. G.; **Rev. Ion** **7**, 141, 1983.
- SIGTHORSSON, G.; SIMPSON, R. J.; WALLEY, M.; ANTHONY, A.; FOSTER, R.; HOTZ-BEHO, C.; PALIZBAN, A.; POMBO, J.; WATTS, J.; MORHAM, S. G.; BJARNASON, I. COX-1 and 2, intestinal integrity, and pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug enteropathy in mice. **Gastroenterology**. **122 (7)**, 1913-23, 2002.
- SILVA, J. R. M.; **Contribuição para o estudo da flora brasileira**; Rio de Janeiro, p. 81, 1911.
- SILVA, J. R. M.; **O Brasil e suas possibilidades**; Rio de Janeiro, p. 174, 1951.
- SILVA, J. R. M.; **Plantas Medicinais e Industriaes**; Rio de Janeiro, p. 164, 1923.

- SILVA, M. F.; LISBÔA, P. L. B.; LISBÔA, R. C. L.; **Nomes vulgares de Plantas da Amazônia**; INPA: Belém, p. 72, 1977.
- SILVEIRA, S. E.; **Relação do Maranhão**, 1624, p. 12, *apud* Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4ª ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 112, 1998.
- SIMMONDS, N.J.; ALLEN, R.E.; STEVENS, T.R.J.; VAN SOMEREU, R.N.; BLAKE, D.R. RAMPTON, D.S. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, **103**, 186-196, 1992.
- SIMON, R.J.; MAXWELL, Y.H.; GREGORY Y.H.LIP. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **44**, 307-317, 1997.
- SIMONETTI, G.; **MacDonald Encyclopedia of Herbs and Spices**; MacDonald & CO.; Verona, 1991.
- SIMONSEN, R. C.; **História Econômica do Brasil: 1500:1820**; Metalivros: São Paulo, p. 325, 1944.
- SIMPSON, P.J. & FANTONE, J.C. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury. **Circulation Res.** **63(6)**, 1070-9, 1988.
- SIMPSON, R.; ALON, R.; KOBZIK, L.; VALERI, C.R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H.B. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischaemia-reperfusion. **Ann. Surg.** **219**, 444-453, 1993.
- SNYDERMAN, R. & FUDMAN, E. J. Demonstration of a chemotactic factor receptor on macrophages. **J. Immunol.**, **124**, p. 2754, 1980.
- SOARES, F.; **Coisas Notáveis do Brasil**, 1590, *apud* Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4ª ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 112, 1998.

- SOERGEL, K.H. Showdown at the tight junction. **Gastroenterology**, **105**, 1247-1250, 1993.
- SOMASUNDARAM, S.; HAYLLAR, H.; RAFI S.; *et al.* The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. **Scand J. Gastroenterol.** **30**, 289-99, 1995.
- SOUZA, A. F. R. D.; ABREU, C. L. B.; **Arq. Jard. Bot.** Rio de Janeiro, 20, 93, 1977.
- SOUZA, D. G.; VIEIRA, A. T.; SOARES, A. C.; PINHO, V.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q.; TEXEIRA M. M. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J. Immunol.** **173 (6)**, 4137-46, 2004.
- SPANEVELO, R. A.; VILA, A. J.; **Phytochemistry** **35**, 537, 1994.
- STASHENKO, E.; WIAME, H.; DASSY, S.; MARTINEZ, R. J.; **J. High Resol. Chromatogr.** **18**, 54, 1995.
- STEIDLER L.; HANS W.; SCHOTTE L.; NEIRYNCK S,; OBERMEIER F.; FALK W.; FIERS WALTER; REMAUT E. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. **Science** **289**, 352-4, 2000.
- STEIN, H.J.; OOSTHUIZEN, M.M.; HINDER, R.A.; LAMPRECHTS, H. Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia/reperfusion in injury. **J. Surg. Res.**, **50**, 398-402, 1991.
- STENSON, W.F. Role of eicosanoids as mediators of inflammation in inflammatory bowel disease. **Scand J. Gastroenterol. Suppl.**, **172**, 13-18, 1990.
- STENSON, W.F. **Animals models of inflammatory bowel disease**. In: Targan RS, Shanahan F. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Baltimore:Williams & Wilkins, 180-192, 1994.
- STOCKER, R. & FREI, B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasm. In: SIED, H. **Oxidative Stress: oxidants and antioxidants**. London: Academic Press, 213-242, 1991.

- STRICKLIN, G. P. et al., Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of human burn wounds. **Am. J. Path.**, **143**, p. 1657, 1993.
- SZABO, S.; TEIER, J. S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HIMAN, H. D.; BRADFORD, J. C. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological Methods** **13**, 59-66, 1985.
- TAKEOKA, G.; FLATH, R. A.; MON, T. R.; BUTTERY, R. G.; TERANISHI, R.; GÜNTERT, M.; LAUTAMO, R.; SZEJTLI, J.; **J. High Resol. Chromatogr.** **13**, 202, 1990.
- TANAKA J. & YUDA Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. **Biol Pharm Bull** **19**, 716-720, 1996.
- TANAKA, S., AKIMOTO, M., TAMBE, Y., TABATA, M.; **Phytot. Res.** **10**, 238, 1996.
- TANAKA, K. & SUEISHI, K. Biology of disease: the coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis. **Lab. Invest.**, **69**, p.5, 1993.
- TANNAHILL, C.L.; STEVENOT, S.A.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; NICK, H.S.; VALENTINE, J.F. Induction and immunolocalization of manganese superoxide dismutase in acute acid-induced colitis in the rat. **Gastroenterology** **109**, 800-811, 1995.
- TATEISHI, H.; MITSUYAMA, K.; TOYONAGA, A.; *et al.* Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. **Digestion.** **58**, 271-81, 1997.
- TEIXEIRA, E.; **Óleo de Copaíba**; Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1923.
- TEIXEIRA, M.G.; BRUNETTI NETTO, C.; ROSOKY, R.M.; HABR-GAMA, A.; PINOTTI, H.W. Manifestações extra-intestinais da retocolite ulcerativa. **Rev. Bras. Coloproct.** **8**, 45-49, 1988.
- TILLOTSON, N. E.; **U.S. pat 2.379.389**, 1945.
- TRAVAÇOS, S. **Declaração do Brasil**, 1596, p. 37, *apud* Cunha, A. G.; *Dicionário Histórico das Palavras Portuguesas de Origem Tupi*, 4ª ed., Companhia Melhoramentos: Brasília, p. 112, 1998.

- TRIPATHI, Y.B.; SHARMA, M.; MANICKAM, M. Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cardifolia*. **Indian j. Biochem. Biophys.**, 34, 302-306, 1997.
- TSCHIRCH, A.; KETO, E. **Arch. Pharm.** **548**, 1901.
- TZENG, D. Y. *et al.* Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. **Blood**, **66**, p. 179, 1985.
- UCHIYAMA, M., MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry** **86**, 271-278, 1978.
- UDUPA, S. L.; UDUPA, A. L.; KULARNI, D. R. Studies on the antiinflammatory and wound healing properties of *Moringa oleifera* and *Aegle marmelos*. **Fitoterapia** **65**, 119-123, 1994.
- VANE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. **Nature** **231**, 232-235, 1971.
- VAN DEN ABEELE A.; POURTOIS, M.; COURTOIS, P. Fluoride inhibition of SCN and Cl peroxidase activities in whole saliva and of recombinant myeloperoxidase. Influence of pH and hydrogen peroxide concentration. **J. Biol. Buccale**, **20**, 219-24, 1992.
- VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais da Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático**; CNPq-MPEG: Brasília, p. 145, 1982.
- VAN HOGZAND, R.A. Medical management of patients with difficult-to-treat inflammatory bowel disease. **Neth. J. Med.** **45**, 55-59, 1994.
- VEIGA JR., V. F.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- VEIGA JR., V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, J. R. A.; **Quim. Nova** **18**, 262, 1995.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; Patitucci, M. L.; **Quim. Nova** **20**, 612, 1997.
- VEIGA JR., V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; **Phytot. Res.** **15**, 476, 2001.

- VELJACA, M., LESCH, C. A., PLLANA, R., SANCHEZ, B., CHAN, K., GUGLIETTA, A.
J. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **272**, 417-422, 1995.
- VENGE, P. Eosinophil activity in bronchial asthma. **Allergy Proc.** **15(3)**, 139-41, 1994.
- VIEIRA, L. S.; **Fitoterapia da Amazônia**; 2^a ed.; Editora Agronômica Ceres: São Paulo, p. 347, 1992.
- VOGT, C.; LEMOS, J. A. G.; **Cronistas e Viajantes**; vol. I, Ed. Abril: São Paulo, p. 30, 1982.
- VON MARTIUS, C. F. P.; **Systema de Materia Medica Vegetal**; Eduardo & Henrique Laemmert: Rio de Janeiro, p. 206, 1854.
- VON MARTIUS, F.; BENTHAM; **Flora Brasiliensis**, **15**, 240, 1870.
- YIM, T.K.; WU, W.K.; MAK, D.H.; KO, K.M. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum* ex vivo. **Planta Med.**, **64**, 607-611, 1988.
- WAKAO, Y.; **Bras. PI BR 78 03/792**, **1978**.
- WALLACE, J.L. Release of platelet activating factor (PAF) and accelerated healing induced by a PAF antagonist in an animal model of chronic colitis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **66**, 422- 425, 1988.
- WALLACE, J.K.; BRAQUET, P.; IBBOTSON, G.C.; MACNAUGHTON, W.K.; CIRINO, G. Assessment of the role of platelet activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease. **J. lipid Med.** **1**, 13-23, 1989.
- WARREN, B.F. & WATKINS, P.E. Animals models of inflammatory bowel disease. **J. Pathol.** **172**, 313-16, 1994.

- WENNINGER, J. A.; YATES, R. L.; DOLINSKY, M.; **J. Am. Org. Anal. Chem.** **50**, 1304, 1967.
- WERB, Z.; BANDA, M. J.; JONES, P. A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages I: proteolyses of elastin, glycoproteins and collagens by proteinases isolated from macrophages. **J. Exp. Med.**, **152**, p. 1340, 1980.
- WILSON, I.C.; GARDNER, T.J.; DINATALE, J.M.; GILLINOV, A.M.; CURTIS, W.E.; CAMERON, D.E. temporary leukocyte depletion reduces ventricular dysfunction during prolonged postischemic reperfusion. **J. thorac. Cardiovasc. Surg**, **106(5)**, 805-10, 1993.
- WOLFF, H.; PANHANS, A.; ZEBHAUSER, M.; MEURER, M. Comparison of three methods to detect white blood cells in semen leukocyte esterase dipstick test granulocyte elastase enzymeimmunoassay and peroxidase cytochemistry. **Fertil Steril**, **58(6)**, 1260-2, 1992.
- WOOD, H. C.; LAWALL, C. H.; YOUNGKEN, H. W.; OSOL, A.; GRIFFITH, I.; GERSHENFELD, L.; **The dispensatory of the United States of America**, J. B. Lippincott Company: London, 22^a ed., p. 369, 1940.
- WRIGHT, S. D. & MEYER, B. C. Fibronectin receptor of human macrophages recognizes sequence Arg-Gly-Asp-Ser. **J. Exp. Med.**, **162**, p. 762, 1985.
- WYSOCKI, A. B. & GRINNELL, F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. **Lab. Invest.**, **63**, p.825, 1990.
- YAMADA, T.; FUJINAMOTO, K.; TSO, P.; FUJINAMOTO, T.; GAGINELLA, T.S.; GRISLAM, M.B. Misoprostol accelerates colonic mucosal repair in acetic acid induced colitis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **260**, 313-18, 1992.
- YAMAHARA, J.; **Yakugaku Zasshi** **112**, 645, 1992.
- YOSHIKAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIDA, N.; YAMAMOTO, H.; KITAZUMI, S.; TAKAHASHI, S.; NAITO, Y.; KONDO, M. Effect of z-103 on TNBS-induced colitis in rats. **Digestion** **58**, 464-468, 1997.

- ZAHAVI, I.; BURG, Z.; MARCUS, H.; KARMELI, F.; NUSINOVITZ, M.; DINARI, G.
Therapeutic effect of colloid bismuth subcitrate in experimental colitis in the
rat. **Digestion** **56**, 211-13, 1995.
- ZEKOVIC, Z.; PEKIE, B.; LEPOJEVIC, Z.; PETROVIC, L.; **Chromatogr.** **39**, 587,
1994.
- ZHANG, D.; YASUDA, T.; YU, Y.; ZHENG, P.; KAWABATA, T.; MA, Y.; OKADA, S.
Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty
acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. **Free
Radic. Biol. Med.**, **20**, 145-150, 1996.
- ZHENG, G.Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T.; **J. Nat. Prod.** **55**, 999, 1992.

9.PUBLICAÇÕES

9.PUBLICAÇÕES

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SOUSA E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin in rats on acetic acid-induced colitis. **Journal of Ethnopharmacology**. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO. Editor: Dr. D. D. Soejarto.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, **75**, 1979-1987. 2004.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, **85**, 1-5, 2003.

DE ALENCAR CUNHA, K. M.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytotherapy research**, **17**, 320-324, 2003

PAIVA, L. A. F.; DE ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, **16**, 737-739, 2002.

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