



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga*
Hayne (*Fabaceae*).**

DOUTORANDO: EDUARDO DA SILVA GONÇALVES

RECIFE

2014

EDUARDO DA SILVA GONÇALVES

**Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga*
Hayne (*Fabaceae*).**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Doutorado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

RECIFE
2014

EDUARDO DA SILVA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE USO DO ÓLEO DE COPAIFERA MULTIJUGA
HAYNE (FABACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 06/06/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wilson da Costa Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. João Henrique Costa Silva (Examinador Externo)
CAV / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS.

A

Almir Gonçalves Wanderley; Alice Valença Araújo; Camila Luiz Gomes; Carlos Fernando Brasileiro de Vasconcelos; Cristiano Ribeiro de Lima; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro; Fredsson José Soares; Geanne Karla N. Santos; Germana Freire Rocha; Gibson Gomes de Oliveira; Gustavo Santiago Dimech; Héliida Maria de Lima Maranhão Brasileiro; Jacinto da Costa Silva Neto; João Henrique da Costa Silva; José Antônio Pereira Júnior; José Roberto Fernandes Ferreira; Juliano Ribeiro da Silva; Leucio Duarte Vieira Filho; Luís Alberto Lira Soares; María Cecilia Veltrán; Melissa Barros Lima Nery; Nerilin Trajano; Petrus Haluli de Medeiros; Rejane de Souza Silva; Sebastião José de Melo.

Ao laboratório PRONATUS do Amazonas[®] por ter cedido o óleo de copaíba para realização desse estudo.

Ao FINEP pelo financiamento do estudo.

A presença de cada um deles, em momentos únicos, desviou o fluxo de eventos a tomadas de decisões que convergiram a esta obra.

Que DEUS os abençoe!



Ao

Mestre Severino Andrade, pelo tempo de habilidade.



A

Minha família!

Sem ela as palavras conseguintes não chegariam a você.

Se estiveres à espera das condições ideais para realizar qualquer propósito, nunca farás coisa alguma - quem somente observa o vento, nunca semeará, e o que olha para as nuvens nunca segará (ECLESIASTES 11:4).

Quando os problemas são absurdos, os desafios são apaixonantes. Não há penitência maior do que DEUS coloca em nossas vidas todos os dias (Dom HÉLDER CÂMARA).

As respostas para o desconhecido estão ao nosso redor (BRIAN VAUGHAN).

É se a trombeta possuir um som confuso, quem se preparará para a batalha? Assim também vós: se não usardes uma linguagem clara, como sereis entendido? Na verdade estareis falando ao vento (1 CORÍNTIOS 14:8-9).

Os movimentos que estão em harmonia com o fluxo natural estão livres de um movimento inútil. Uma

Acolhei minha disciplina, e não o dinheiro; e minha doutrina, mais que o ouro puro. Pois a sabedoria é melhor do que as joias, e tudo o que é desejável não se compra com ela! (PROVÉRBIOS 8:10-11).

variedade de técnicas

Tolice é: proceder sempre do mesmo modo e esperar resultados diferentes (ALBERT EINSTEIN).

liberadas sucessivamente, cada uma, ligada à próxima, se transforma em novas maneiras inesperadas

(MASATOSHI NAKAYAMA).

Gente grande sabe que é pequena e, por isso, cresce. Gente pequena acha que é grande, por isso, continua pequena, e sua única maneira de ficar maior é diminuir os outros (ΣΟΦΡΑΤΗΣ - SÓCRATES)

A biologia precisa de um vocábulo melhor que 'erro' para a força propulsora da evolução. Ou, talvez, 'erro', sirva, afinal, se a gente lembrar que ele provém de uma velha raiz que signifique: 'vaguear em busca de algo' (LEWIS THOMAS).

Tudo tem a sua própria ocasião, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu (ECLESIASTES 3:1).

Tira de palma cozida - depois de limpas, corte-as em tiras e ponha para cozinhar com sal. "Quem nunca precisou comer diz que é alimento muito rico em fibras e proteínas" (LAURENE ALMEIDA - Culinária da fome).

Simplicidade é complexidade resolvida (CONSTANTIN BRANCUSI).

Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que sirva o universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo mais estranho e inexplicável. Existe outra teoria que diz que isso já aconteceu

(DOUGLAS ADAMS) 🙌.

RESUMO

O óleo de copaíba é usado pela população sendo encontrado em farmácias e outros estabelecimentos. É extraído de espécies de *Copaifera* (*Fabacea*), sendo a mais utilizada no Brasil a *Copaifera multijuga* Hayne. Em sua constituição encontram-se sesquiterpênicos e ác. palmítico. A literatura o atribui ação antiinflamatória, antinociceptiva, antibacteriana e antitumoral. São escassos trabalhos relacionados à sua toxicidade, nesse sentido, procurou-se avaliar a segurança pré-clínica do óleo de *C. multijuga* (Cm). Para tal, inicialmente confirmou-se a atividade antiinflamatória e antinociceptiva por via oral do óleo nos modelos de peritonite (Cm 200 mg/kg) e de contorções abdominais (Cm 50 a 200 mg/kg), posteriormente foi realizado o teste de toxicidade aguda (DL₅₀) em ratos e finalmente os ensaios por via oral de toxicidade de dose repetida por 4 e 8 semanas em ratos Wistar e 4 semanas em coelhos Nova Zelândia, seguindo os critérios norteadores da ANVISA. Os resultados mostram que o óleo (200 mg/kg) reduziu em 28% o número de leucócitos circulantes, após estímulo com carragenina e que todas as doses (50 – 200 mg/kg) inibiram as contorções abdominais por ác. acético. Na toxicidade aguda não houve morte até a dose de 4,0 g/kg o que revela baixa toxicidade por via oral. Em ratas, a administração do óleo (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) por via oral não produziu mortes ou alteração comportamental, entretanto, houve aumento do ganho de massa, para Cm 200 mg/kg e redução para Cm 2500 mg/kg. O consumo de água aumentou para Cm 2500 mg/kg ao final de 8 semanas. Nos ratos, não houve mortes ou alteração comportamental, mas Cm 2500 mg/kg reduziu a massa corporal na 5ª e 6ª semana e aumentou o consumo de água já na 3ª semana de administração. Os parâmetros hematológicos em ratos de ambos os sexos não foram alterados. Enquanto que nos parâmetros bioquímicos em ratas, avaliados na 4ª semana registrou-se que Cm 2500 mg/kg aumentou os níveis séricos de creatinina (creat), col. VLDL, triglicerídeos (trig), fosfatase alcalina (FA), bilirrubinas T e D (BT e BD), albumina e amilase (amil) e a dose de 500 mg/kg aumentou os níveis de amilase. Ao final da 8ª semana, Cm 2500 mg/kg aumentou creat, col. VLDL, trig, BT e BD, enquanto Cm 500 mg/kg elevou col. VLDL e trig. Nos machos, ao final da 4ª semana, Cm 2500 mg/kg aumentou creat, FA, BT e BD e prot. total e nas doses de 500 e 200 mg/kg aumentou creat. Na 8ª semana, Cm 2500 mg/kg aumentou ureia, creat, col. HDL, FA, BT e BD, albumina, amilase e lactato desidrogenase (LDH), Cm 500 mg/kg, aumentou BD e LDH e Cm 200 mg/kg aumentou BD. Em coelhos de ambos os sexos, Cm 2500 mg/kg aumentou creat, col. total e LDL e BT e BD. Na morfologia de ratos, observaram-se alterações pontuais nas massas absolutas ou relativas no fígado, estômago e adrenal, contudo a análise microscópica dos tecidos não revelou nenhuma alteração. Na toxicidade reprodutiva, o óleo em todas as doses reduziu a massa corporal das mães durante o período de gestação e a massa absoluta dos fetos. Houve também aumento do consumo de água no 14º e 20º dia. Na performance reprodutiva dos machos, o óleo não alterou os parâmetros reprodutivos, assim como, não foram constatadas alterações nos indicadores comportamentais da prole. E finalmente observou-se alteração nos parâmetros globais de avaliação renal em ratos tratados por quatro semanas. Desta forma conclui-se que o óleo possui baixa toxicidade, contudo, merece destaque o possível efeito tóxico materno durante a gestação e sobre a função renal que requerem estudos mais detalhados.

Palavras-chave: Óleo de *Copaifera multijuga* Hayne. Toxicidade. Variáveis reprodutivas. Performance reprodutiva. Função renal.

ABSTRACT

Copaiba's oil is used by population, being found in pharmacies or others stores. It is extracted from species of *Copaifera* (*Fabacea*), being the most useful in Brazil the *Copaifera multijuga* Hayne. Also includes in its composition sesquiterpenes and palmitic acid. Literature attributes to it antiinflammatory, antinociceptive, antibacterial and antitumor actions. There are few works related to its toxicity, in that sense, it seeks to assess preclinical safety of *C. multijuga* oil (Cm). For this purpose, it was initially confirmed the antiinflammatory and antinociceptive activity orally of the oil in peritonitis models (Cm 200 mg/kg) and writhing test (Cm 50 to 200 mg/kg). Subsequently it was conducted the acute toxicity test (LD₅₀) in mice (*Mus musculus*). And finally, it were performed repeated dose toxicity tests orally for 4 and 8 weeks in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and 4 weeks in New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), following the guiding criteria of ANVISA. The results show that the oil (200 mg/kg) reduced by 28% the number of circulating leukocytes, after stimulation with carrageenan and that all doses (50 - 200 mg/kg) inhibited the writhing test induced by acetic acid. There were not deaths for acute toxicity up to a dose of 4.0 g/kg, which means that there is low toxicity orally. Administration of oil orally in rats (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) did not produce deaths or behaviour change. However, there was an increase in body mass for Cm to 200 mg/kg and a reduction for Cm 2500 mg/kg. The water consumption increased to Cm 2500 mg/kg at the end of 8 weeks. There were no deaths or behaviour change in rats but at Cm 2500 mg/kg reduced body mass in 5th and 6th week and increased water consumption at the 3rd week of administration. Haematological parameters in rats of both sexes were not changed. While biochemical parameters in rats evaluated at 4th week recorded that Cm 2500 mg/kg increased the serum levels of creatinine (creat), col. VLDL, triglycerides (TG), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin T and D (TB and BD), albumin and amylase (amyl) and the dose of 500 mg/kg increased levels of amyl. At the end of the 8th week, Cm 2500 mg/kg increased creat, col. VLDL, TG, TB and BD while Cm 500 mg/kg raised col. VLDL and trig. In males, at the end of 4th week, Cm 2500 mg/kg increased creat, ALP, TB and BD and total protein and at doses of 500 and 200 mg/kg increased creat. In the 8th week, Cm 2500 mg/kg increased urea, creat, col. HDL, ALP, TB and BD, albumin, amyl and lactate dehydrogenase (LDH), while Cm 500 mg/kg, increased LDH and Cm BD and 200 mg/kg increased BD. In both, male and female rabbits, Cm 2500 mg/kg increased creat, total col. and LDL and TB and BD. The morphology of rats showed that there were punctual changes in the absolute or relative weights of liver tissue, stomach, and adrenal gland, but the microscopic examination of tissue revealed no change. In reproductive toxicity, oil at all doses decreased the body weight of the mother during the pregnancy and the absolute mass of the foetuses. There was also an increase in water consumption in the 14th and 20th day. In the male reproductive performance, the oil neither affected reproductive parameters nor confirmed changes the behaviour indicators of offspring. And finally there was a change in the global parameters of renal evaluation in rats treated for 4 weeks. Thus it is concluded that the oil has low toxicity. However, it is worth highlighting possible maternal toxic effect during pregnancy on renal function, which require more detailed studies.

Keywords: *Copaifera multijuga* Hayne oil. Toxicity. Reproductive variables. Reproductive performance. Renal function.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Copaifera* spp. a) árvore; b) folhas e flores. 21
- Figura 2:** Processo de extração do óleo-resina de copaíba: A) procedimento do furo com o trado em um espécimen de *C. multijuga* na Comunidade Colônia Central-RDS Tupé; B) mangueira e balde coletor acoplados ao furo para extração do óleo-resina; C) procedimento adotado para fechar o furo e possibilitar uma outra exploração no futuro. 22
- Figura 3:** Extração do óleo de copaíba. O óleo escoo pelo orifício 2, quando ambos estão desobstruídos. Ao selar a abertura do orifício 1, cessa-se o escoamento do óleo. 23
- Figura 4:** Sede - Regulação do manejo da água e do sódio (Na^+). 31
- Figura 5:** Regulação do volume de água corporal. 33
- Figura 6:** Regulação da concentração extracelular do potássio (K^+). 34
- Figura 7:** Acidose e regulação da concentração extracelular do potássio (K^+). 35
- Figura 8.** Modelo da metodologia de contorções abdominais. 41
- Figura 9.** Modelo da metodologia de indução de inflamação aguda (peritonite). 42
- Figura 10:** Gaiola metabólica modelo 3701M081 Tecniplast[®]. 48
- Figura 11:** Fotomicrografia do fígado de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Núcleos de hepatócitos (H), células de Kuppfer (K), vasos capilares (v) e a veia centro lobular (V). 70
- Figura 12:** Fotomicrografia do rim de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Glomérulo de malpighi (G), espaço glomerular (EG) e tubos contorcidos proximais (TP). 70
- Figura 13:** Fotomicrografia do coração de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. 71

Células musculares (N) e fibroblastos (F).

Figura 14: Fotomicrografia do pulmão de rato tratado durante oito semanas, 71
coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg.
Bronquíolos (B), sáculo alveolar (SA).

Figura 15: Fotomicrografia do baço de rato tratado durante oito semanas, coloração 71
hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Cápsula (C),
trabéculas (T), polpa vermelha (V).

Figura 16: Fotomicrografia do ovário de rata tratada durante oito semanas, 72
coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg.
Folículos (F) em diversos estágios de amadurecimento e corpo lúteo (CL).

Figura 17: Fotomicrografia do útero de rata tratada durante oito semanas, coloração 72
hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Epitélio
endometrial (E), tecido conjuntivo frouxo (TC), glândulas endometriais (GE).

Figura 18: Fotomicrografia do túbulo seminífero em corte transversal de testículo 73
de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina coloração
hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Tecido
germinativo (TG) e espermatozóides (SP).

Figura 19: Fotomicrografia do cérebro de rato tratado durante oito semanas, 73
coloração hematoxilina eosina (aumento de 200x). A) Grupo controle água, B) Cm
2500 mg/kg. Neurônios piramidais (P) e células gliais (g).

Figura 20: Soro dos ratos tratados por quatro semanas com *C. multijuga* (2500 86
mg/kg) por via oral observando tonalidade mais escura em relação ao grupo
controle.

Figura 21: Reabsorção de HCO_3^- . CA = anidrase carbônica; hNBC = 99
cotransportador Na^+ - bicarbonato humano (carreador eletrogênico).

Figura 22: Fluxo urinário, poliúria, polidipsia, reabsorção de HCO_3^- e acidose. CA = 100
anidrase carbônica; hNBC = cotransportador humano de Na^+ - bicarbonato (carreador
eletrogênico).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual dos componentes do óleo de <i>C. multijuga</i> .	52
Tabela 2. Efeito do óleo de copaíba (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) e da indometacina sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	53
Tabela 3. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200; 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por quatro semanas consecutivas.	58
Tabela 4. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200; 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por oito semanas consecutivas	59
Tabela 5. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200; 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por quatro semanas consecutivas.	60
Tabela 6. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por oito semanas consecutivas.	61
Tabela 7. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas tratadas por quatro semanas consecutivas.	63
Tabela 8. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas tratadas por oito semanas consecutivas.	64
Tabela 9. Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados por quatro semanas consecutivas.	65
Tabela 10. Efeito da administração do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros bioquímicos em ratos Wistar machos tratados por oito semanas consecutivas.	66

Tabela 11. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) 68
administrado por via oral sobre a massa dos órgãos de ratas tratadas por oito
semanas.

Tabela 12. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) 69
administrado por via oral sobre a massa dos órgãos de ratos tratados por oito
semanas.

Tabela 13. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 77
2500 mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento durante a
prenhez (1º ao 20º dia).

Tabela 14. Efeito do tratamento por via oral com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 79
500 e 2500mg/kg) por oito semanas consecutivas sobre as variáveis de reprodução
obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x
fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Tabela 15. Parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do 80
grupo tratado com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500mg/kg) por oito
semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho
e fêmea não tratados).

Tabela 16. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por 82
via oral nos parâmetros bioquímicos em coelhos adultos da linhagem Nova Zelândia
tratadas por quatro semanas consecutivas.

Tabela 17. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por 84
via oral nos parâmetros bioquímicos da urina em ratos tratados por quatro semanas
consecutivas.

Tabela 18. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por 85
via oral nos parâmetros bioquímicos séricos de avaliação renal em ratos tratados
por quatro semanas consecutivas.

Tabela 19. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por
via oral nos parâmetros globais de avaliação renal em ratos tratados por quatro
semanas consecutivas.

LISTA DE GRÁFICOS.

- Gráfico 1:** Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200 mg/kg) na peritonite em camundongos (n=6). 53
- Gráfico 2:** Ganho de massa corporal de ratas tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 55
- Gráfico 3:** Consumo de água de ratas tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 55
- Gráfico 4:** Consumo de ração de ratas tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 56
- Gráfico 5:** Ganho de massa corporal de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 56
- Gráfico 6:** Consumo de água de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 57
- Gráfico 7:** Consumo de ração de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). 57
- Gráfico 8:** Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o ganho de massa corporal materna durante a prenhez em relação ao grupo controle. 75
- Gráfico 9:** Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o consumo de água durante a prenhez em relação ao grupo controle. 75
- Gráfico 10:** Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o consumo de ração durante a prenhez em relação ao grupo controle. 76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.	20
2.1.	<i>Copaifera multijuga</i> Hayne.	20
2.2.	Atividade antinociceptiva e antiinflamatória do gênero <i>Copaifera</i> (<i>Fabaceae</i>).	25
2.3.	Toxicidade de doses repetidas.	26
2.4.	Reprodução e teratogênese.	27
2.5.	Drogas na gestação.	28
2.6.	Droga e o embrião.	29
2.7.	Sede - regulação do manejo da água e do sódio (Na ⁺).	30
2.8.	Regulação do volume de água corporal.	31
2.9.	Regulação da concentração extracelular de potássio (K ⁺).	33
3	OBJETIVOS.	37
3.1.	Geral.	37
3.2.	Específicos.	37
4	MATERIAL E MÉTODO.	39
4.1.	Material vegetal.	39
4.2.	Análise química do óleo de <i>C. multijuga</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/EM).	39
4.3.	Animais.	40
4.4.	Avaliação da atividade antinociceptiva do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) por contorções abdominais em camundongos.	40
4.5.	Avaliação do efeito antiinflamatório agudo – peritonite - do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200 mg/kg) em camundongos.	41
4.6.	Toxicidade aguda.	42
4.7.	Toxicidade de dose repetida.	43
4.7.1.	Avaliações dos efeitos da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) em ratos de ambos os sexos.	43
4.7.2.	Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.	43
4.7.3.	Estudo morfológico.	44
4.8.	Avaliação das variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento de ratas durante a prenhez (1 ^o ao 20 ^o dia).	44
4.9.	Avaliação das variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).	45
4.9.1.	Avaliação dos parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).	46
4.10.	Avaliação da função renal.	46

4.10.1.	Análise dos parâmetros bioquímicos em coelhos Nova Zelândia adultos de ambos os sexos tratados via oral por quatro semanas com o óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 2500 mg/kg).	46
4.10.2.	Avaliação da função renal em ratos tratados por via oral com o óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 2500 mg/kg) durante quatro semanas.	46
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.	50
6	RESULTADOS.	52
6.1.	Percentual dos componentes do óleo de <i>C. multijuga</i> .	52
6.2	Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) nas contorções abdominais em camundongos.	53
6.3.	Efeito do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200 mg/kg) na inflamação aguda – peritonite - em camundongos.	53
6.4.	Toxicidade aguda.	54
6.5.	Efeito da administração em doses repetidas por via oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm) sobre os ratos.	54
6.6.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm) sobre o ganho de massa e consumo de água e ração em ratos.	54
6.7.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm) sobre os parâmetros hematológicos em ratos de ambos os sexos.	57
6.8.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos de ambos os sexos.	62
6.9.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre os aspectos macroscópicos e o peso dos principais órgãos em ratos de ambos os sexos.	67
6.10.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/Kg) sobre a morfologia dos órgãos de ratos de ambos os sexos.	70
6.11.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre ratas prenhas.	74
6.11.1.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o ganho de massa corporal, consumo de água e ração das ratas durante a prenhez.	74
6.11.2.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, após o tratamento durante a prenhez (1º ao 20º dia).	76
6.12.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre as variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).	78

6.12.1.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre os parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).	80
6.13.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros de avaliação renal.	81
6.13.1	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos em coelhos.	81
6.13.2.	Efeito da administração oral do óleo de <i>C. multijuga</i> (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros de avaliação renal em ratos.	83
7	DISCUSSÃO.	89
8	CONCLUSÃO.	102
	REFERÊNCIAS.	104
	ANEXOS	115

Introdução.

1 INTRODUÇÃO.

A copaíba é uma das plantas de uso medicinal mais utilizada e conhecida no Brasil (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). O óleo-resina extraído do tronco da árvore da copaibera pode ser encontrado à venda em quase todas as feiras livres, mercados populares, ervanários e farmácias de produtos naturais de todo o país (MACIEL et al., 2002).

Estudos fitoquímicos mostraram que o óleo de *C. multijuga* apresenta em sua composição ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oléico, ácido linoleico, ácido aráquico e ácido beênico) (CRAVEIRO et al., 1978), e, também é composto essencialmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos. O ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e o α -copaeno são os principais componentes, sendo o ácido copálico o componente mais comum sendo usado como um biomarcador para a sua autenticidade (SOARES et al., 1978).

O uso deste óleo tem sido indicado, principalmente, pela sua ação antiinflamatória (CARVALHO et al., 2005; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007), antitumoral (LIMA et al., 2003), antimicrobiana (SANTOS et al., 2008; TINCUSI et al., 2002), atividade antinociceptiva (GOMES et al., 2007) e diurética (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Nos últimos anos, estudos sobre a atividade analgésica e antiinflamatória do óleo-resina em várias espécies de *Copaifera* justificaram sua ampla utilização para a população (GOMES et al., 2007).

Porém, o uso de plantas medicinais e seus constituintes podem ocasionar efeitos adversos, caracterizando assim um problema sério de saúde pública. Estes efeitos, as possíveis adulterações nos produtos e toxicidade, bem como a ação sinérgica com outras drogas ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da sua comercialização pelos órgãos oficiais (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005). Além disso, as plantas podem apresentar na sua constituição substâncias capazes de causarem efeitos adversos no organismo, que podem interferir no funcionamento de órgãos vitais e não-vitais (REBOREDO et al., 2007). Isto ocorre apenas quando há uma interação do agente químico com o organismo implicando em efeitos ao nível tecidual e celular (DRAIZE et al., 1944).

Testes toxicológicos permitem avaliações de parâmetros, como o acompanhamento da massa corporal do animal, consumo de água e ração (JAHN; GÜNZEL, 1997), as condições anatomopatológicas dos órgãos e os parâmetros bioquímicos e hematológicos, a influência na reprodução (REBOREDO et al., 2007), interferência na maturação sexual, na produção e no transporte de gametas, no ciclo espermatogênico, no comportamento sexual e na fertilidade

(KIMMEL et al., 1995). Estes parâmetros servem para caracterizar a relação dose-resposta e também a escolha de doses nos estudos de exposição crônica a determinadas substâncias (BARNES; DOURSON, 1988).

Considerando-se que o uso deste óleo como agente antiinflamatório e cicatrizante é relatada desde o século XVI, e os dias de hoje, estas aplicações medicinais atingem todas as regiões do Brasil (MACIEL et al., 2002), este estudo tem como objetivo confirmar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória, em camundongos (*Mus musculus*), e principalmente avaliar o efeito do óleo de *C. multijuga* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos a tratamento via oral por oito semanas, bem como o reflexo no perfil bioquímico em coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), tratados por quatro semanas, seguindo o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução -RE N° 90, de 16 de março de 2004.

Revisão da literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. *Copaifera multijuga* Hayne.

O gênero *Copaifera* pertence à família *Fabaceae* e possui mais de 25 espécies, sendo a maioria delas encontrada na América do Sul. Na região Amazônica, há uma grande diversidade de espécies, que podem ser encontradas nas matas de terra firme e nos solos argilosos e arenosos, em todos os estados da região. As espécies são muito semelhantes entre si, principalmente no tamanho da árvore, de porte grande, formando o teto da floresta da mata virgem (LEITE, 2001).

A espécie mais estudada é a *Copaifera multijuga* Hayne, que ocorre desde o médio Tapajós até a Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia). Está presente também, nas regiões sul de Roraima e norte de Mato Grosso. Inventários florestais realizados em algumas áreas de ocorrência na região indicam a presença de árvores adultas em densidades que variam na média de 0,1 a 2,0 exemplares por hectare (LEITE, 2001).

A *C. multijuga* é uma árvore, semelhante as do seu gênero, de grande porte (Figura 1), que é encontrada em todo o Brasil, sendo popularmente conhecida como copaíba, pau-d'óleo, copaíba-roxa e copaíba-mari-mari. A árvore da copaíba pode atingir até 36 metros de altura, possui copa densa, casca lisa (0,5 cm - 2,0 cm de espessura), fuste reto (diâmetro entre 40 a 50 cm), diferenciando-se das espécies do mesmo gênero pelas flores maiores, brancas e pelo tamanho dos folíolos e dos frutos. Os frutos são vagens avermelhadas (3,5 cm de comprimento, 3,0 cm de largura e 1,5 cm de espessura) com 1 ou 2 sementes. Essa espécie apresenta de 1200 a 2000 sementes férteis por árvore. As sementes são ovais, quase globosas, com arilo amarelo intenso. Esta espécie pode produzir de 2 a 3 kg de sementes. A floração ocorre de janeiro a março e os frutos são coletados de março a agosto. A mudança foliar ocorre em dezembro, com perda parcial das folhas no mês anterior à floração (YUNES; CECHINEL, 2001; AZEVEDO et al., 2004). Os habitantes da floresta identificam a copaíba pelo forte aroma de sua casca e pela presença de pequenos animais silvestres que se alimentam de seus frutos (LEITE, 2001).

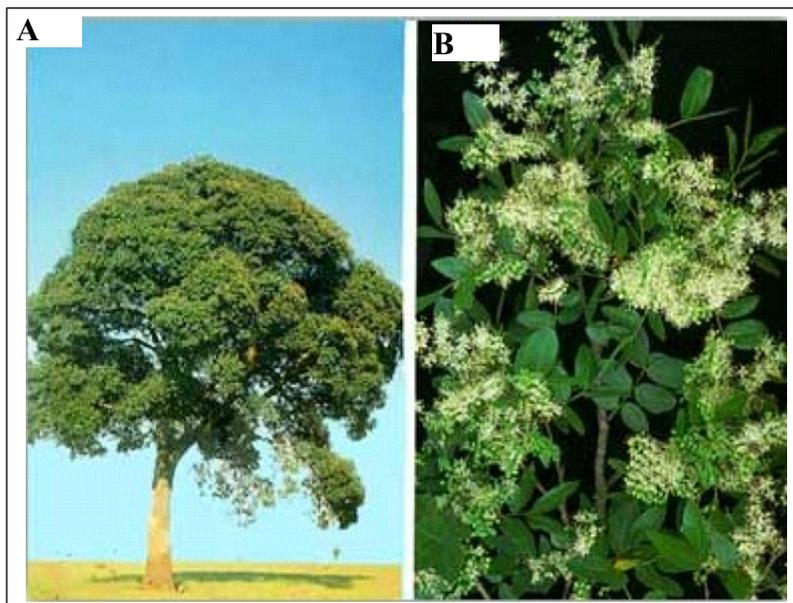


Figura 1. *Copaifera* spp. A) Árvore; B) Folhas e flores.
Fonte: LORENZI; MATOS, 2005.

Dentre as partes da copaíba mais utilizadas pela população, destaca-se o óleo extraído do tronco da árvore. O óleo de copaíba, como é conhecido, provém de canais esquizolizígeos (CASCON, 2004), que são secretores, localizados em todas as partes da árvore. São canais formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos). O caráter mais saliente desse aparelho está no lenho (CASCON, 2004), onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com traçados irregulares em camadas lenhosas muitas vezes sem se comunicarem. Este óleo é o produto resultante da exsudação das árvores de copaíba, e que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982).

O óleo-resina pode ser obtido através da perfuração no tronco da copaíba (Figura 2) (FRANCISCO, 2005; RAMOS, 2006). Diversas formas de extração eram utilizadas para a exploração do produto, a maioria delas provocava danos sérios às árvores ou até mesmo a sua morte (MATTA, 1913). Atualmente, uma técnica tem sido considerada a única prática não agressiva, e é hoje a mais utilizada, consistindo na perfuração do tronco com um trado em dois furos. O primeiro deve ser feito 1,0 metro acima da base da planta e o segundo de 1,0 a 1,5 metros acima do primeiro (Figura 3) (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006). Insere-se então um cano de PVC de $\frac{3}{4}$ (três quartos) de polegada nos orifícios, por onde o óleo escoar, e reserva-se o óleo. Após a finalização da extração, veda-se o orifício para proteção contra fungos e cupins (OLIVEIRA et al., 2006; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006) com o uso de argila (RAMOS, 2006) ou tampa vedante de

plástico (OLIVEIRA et al., 2006), sendo ambas de fácil retirada para posteriores colheitas de óleo com maior facilidade de manipulação (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006).

Na primeira extração, o volume do óleo é muito variado (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004). A produção anual por árvore pode chegar, segundo alguns autores, a 50 litros/árvore (MATTA, 1913; GRIEVE, 1995). A média de retirada de óleo, por vez para cada árvore, varia de 0,3 a 3,0 litros, dependendo da espécie e condições às quais está submetida. Não há, porém, estudos definitivos sobre o tempo necessário para uma copaíba recompor o óleo extraído. Sabe-se também que não se extrai óleo de todas as árvores de copaíba, mas não existem estudos precisos da média de árvores efetivamente fornecedoras de óleo, o que pode variar de acordo com as características do solo, clima, espécie da *Copaifera* e época seca ou chuvosa (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).



Figura 2: Processo de extração do óleo-resina de copaíba: A) procedimento do furo com o trado em um espécimen de *C. multijuga* na Comunidade Colônia Central-RDS Tupé; B) mangueira e balde coletor acoplado ao furo para extração do óleo-resina; C) procedimento adotado para fechar o furo e possibilitar outra exploração no futuro.

Fonte: BARBOSA et al. (2009).



Figura 3: Extração do óleo de copaíba. O óleo escoo pelo orifício 2, quando ambos estão desobstruídos. Ao selar a abertura do orifício 1, cessa-se o escoamento do óleo.

Fonte: PIERI et al. (2009).

O óleo de copaíba é um líquido transparente, viscoso e fluido, com cheiro forte e odor de cumarina, sabor acre e amargo. Pode ser armazenado por até dois anos sem alterar as suas propriedades, podendo transformar-se em resina se exposto ao ar e à luz. As características do óleo variam com a procedência da copaíba e do tipo de solo (PLOWDEN, 2003). Normalmente, o óleo de copaíba apresenta as seguintes características físico-químicas: densidade de 0,8925 mg/mL, índice de acidez de 0,5%; índice de saponificação de 0,9%; índice de acetila de 10,6%; índice de iodo de 147,2% e insaponificação de 64,8% (SEBRAE/SUFRAMA/MMA, 1998).

Estudos fitoquímicos mostraram que o óleo de *C. multijuga* apresentava a seguinte composição de ácidos graxos: ácido palmítico (24,9%); ácido oléico (35,3%); ácido linoleico (35,7%), ácido aráquico (1,1%); ácido beênico (3,0%) e cumarinas (0,2%) (CRAVEIRO et al., 1978), e, que, o óleo de copaíba também é composto essencialmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos. O ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e o α -copaeno são os principais

componentes do óleo (SOARES et al., 2003). Normalmente, o óleo de copaíba apresenta a seguinte composição: α -cubeno, 2,9 - 3,2%; α -copaeno, 7,9 - 18,7%; β -cariofileno 46,1 - 47,0%; α -humuleno 5,4 - 5,6%; β -bisaboleno 5,9 - 6,1%; cadineno, 6,0 - 6,2%, e, outros compostos não identificados, aproximadamente 13,5% (SOARES-MAIA et al., 1978; CASCON; GILBERT, 2000).

O óleo da copaíba era largamente utilizado entre os índios, indicando que o uso desse óleo veio da observação do comportamento de certos animais que quando feridos esfregavam-se nos troncos das copaibeiras. Os índios o utilizavam principalmente como cicatrizante e no umbigo de recém-nascidos para evitar o tétano neonatal, conhecido popularmente como o mal-dos-sete-dias, que é causado pelo *Clostridium tetani*, bacilo gram positivo de natureza anaeróbica de grande resistência, e que é uma das principais causas da mortalidade neonatal em certos países subdesenvolvidos, e, em algumas situações, pode representar cerca de 30% a 50% destas mortes (MELGAARD et al., 1988; HILL et al., 1992).

Na prática indígena, os guerreiros quando voltavam de suas lutas untavam o corpo com o óleo da copaíba e se deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para curar eventuais ferimentos (FERREIRA, 1999; LEITE, 2001). O uso do óleo de copaíba, assim como de outros remédios indígenas, foi difundido entre os brancos no século XVII, quando os primeiros médicos residentes no Brasil tentavam contornar a escassez de remédios cujo suprimento à colônia era irregular (FERREIRA, 1999).

Segundo Azevedo et al. (2004), e Agra et al. (2007; 2008), as indicações etnofarmacológicas mais usuais do óleo de copaíba são: a) para as vias urinárias, como antiblenorrágico, antiinflamatório, antigonorréico, antisséptico, estimulante e no tratamento de cistite, incontinência urinária e sífilis; b) para as vias respiratórias, antiasmático, expectorante, no tratamento de bronquite, inflamação da garganta, hemoptise, pneumonia e sinusite; c) para as infecções da derme e mucosa, como dermatites, eczemas, psoríases e ferimentos; d) para úlceras e feridas do útero e) outras finalidades, como afrodisíaco, antitetânico, antirreumático, anti-herpético, anticancerígeno, antitumoral (tumores da próstata), no tratamento de leishmaniose e da leucorréia, contra paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra também são relatados.

Estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* vêm demonstrando que os óleos extraídos de espécies do gênero *Copaifera* possuem atividade antiinflamatória, cicatrizante, antitumoral, tripanossomicida, bactericida, inseticida e repelente de insetos (SOARES et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004). Estudos realizados por Vasconcelos et al. (2008) e Mendonça e Onofre (2009), demonstraram que o óleo da copaíba apresenta uma significativa atividade antimicrobiana frente a certos microrganismos patogênicos ao homem, tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Apesar de vários estudos demonstrarem a atividade farmacológica do óleo de copaíba e sua indicação para o tratamento de várias afecções, são poucos os estudos avaliando a segurança do seu uso pela população. Estudos de Tavares et al. (2006) avaliaram a segurança clínica do uso de uma formulação fitoterápica (Saratosse[®], Floramel Indústria e Comércio Ltda. Brasil) composta da associação de *Mikania glomerata*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globulus* e *C. multijuga*, incorporadas à própolis e mel para tratar doenças respiratórias. Este ensaio clínico consistiu de um estudo aberto, com 26 voluntários adultos de ambos os sexos, que receberam quatro doses orais de 15 mL de Saratosse[®], durante 28 dias ininterruptos. Alguns eventos adversos como diarreia, pirose, náuseas, disúria, flatulência, mialgia, enxaqueca, dor abdominal, odontalgia, cefaléia, sonolência, mal estar, gripe e faringite foram relatados, entretanto os autores não atribuíram estes efeitos ao fitoterápico, já que todos os parâmetros laboratoriais estiveram dentro das suas respectivas faixas de normalidade. Os exames clínicos, eletrocardiográficos e laboratoriais não evidenciaram sinais de toxicidade nos órgãos e sistemas avaliados.

Outro estudo, realizado por Lourenço et al. (2009), com outra espécie do gênero *Copaifera*, a *C. langsdorfii*, foi avaliada a toxicidade materna e teratogenicidade do óleo extraído de seu tronco. Neste estudo, os autores observaram que o óleo de *C. langsdorfii* administrado por via oral - nas doses de 0,3; 0,6 e 0,9 mL/kg - durante o período de organogênese da prenhez de camundongas não induziu toxicidade materna, nem causou teratogenicidade na prole das fêmeas tratadas, sugerindo a segurança do óleo durante o período gestacional.

2.2. Atividade antinociceptiva e antiinflamatória do gênero *Copaifera* (*Fabaceae*).

Entre as propriedades medicinais do óleo de copaíba, a mais estudada foi a antiinflamatória. Basile et al. (1988) estudaram a atividade do óleo de copaíba comercial, utilizando diversos modelos em ratos. Houve inibição de edema induzido por carragenina, redução da formação de granuloma e diminuição da permeabilidade vascular ocasionada pela liberação intradérmica de histamina. Os resultados alcançados indicam que o óleo realmente possui atividade antiinflamatória, contudo neste trabalho não houve a indicação da espécie de *Copaifera* que proveio o óleo.

Já Gomes et al. (2007), relataram que o óleo de *C. multijuga* e de *C. reticulata* Ducke apresentou atividade antinociceptiva periférica e central, provavelmente por meio de receptores opióides em modelos de dor estimulada por ácido acético, formalina e altas temperaturas em camundongos.

O modelo de indução do edema por carragenina é utilizado para avaliação da atividade antiinflamatória de novas medicações em respostas agudas mediadas por prostaglandinas e cininas

(LORAM et al., 2007). Por meio deste, Viriato et al. (2009), comprovaram o efeito inibitório do edema, quando o óleo de copaíba foi testado em alta diluição. Os resultados sugerem que o mecanismo envolvido interfere na atividade da ciclooxigenase, enzima produtora de importantes mediadores da inflamação. O óleo de copaíba em alta diluição também foi capaz de inibir a formação de tecido granulomatoso em até 18%, comparado ao grupo controle.

Os óleos das espécies de *C. multijuga*, *C. cearenses* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke foram comparados quanto à atividade antiinflamatória através da avaliação da reação sob a cavidade pleural induzida por Zimosan. As três espécies apresentaram diminuição do número de leucócitos e neutrófilos, além de inibirem a produção de óxido nítrico. A *C. multijuga* foi a mais potente, comprovando atividade antiinflamatória semelhante a do diclofenaco (VEIGA-JUNIOR et al., 2007).

Martins e Silva (2010) verificaram que a aplicação do óleo resina *in natura* de copaíba, como cobertura primária, conseguiu reduzir o edema local e cessou a exsudação purulenta resultante de processo infeccioso de ferida cutânea em um homem. Demonstra, dessa forma, a efetividade do óleo como antiinflamatório e antimicrobiano, apesar do curto prazo do experimento e da pequena amostragem.

A análise dos cromatogramas das amostras dos óleos-resina de *C. multijuga*, *C. cearenses* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke, demonstrou variações entre os óleos de diferentes espécies, distinguindo os compostos predominantes nos sesquiterpenos (VEIGA-JÚNIOR et al., 2007) destes os principais sesquiterpenos são o beta-cariofileno com ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica, e o β -bisaboleno com ação antinociceptiva e também antiinflamatória (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

2.3. Toxicidade em doses repetidas.

Os principais objetivos dos testes de toxicidade subcrônica são o de estabelecer os níveis nos quais não mais se observam efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas. Examina-se também, após o tratamento, se encontrados efeitos tóxicos, se foram consequência do acúmulo ou não de substâncias no organismo (FAUSTMAN et al., 1994).

Para estes testes são utilizados apenas animais saudáveis, onde a via de administração preferencial é a oral e o tempo de tratamento pode ser de 21 a 60 dias. Os parâmetros observados

diariamente durante o tratamento são modificações no consumo da ração, no peso dos animais, na cor e textura dos pêlos, alterações respiratórias e circulatórias, anormalidades motoras e de comportamento e aumentos macroscópicos de massas de tecidos (BARNES; DOURSON, 1988).

Os animais são sacrificados ao término dos testes, onde órgãos e sangue são retirados para avaliações anátomo-patológica, bioquímica e hematológica. Estes parâmetros servem para caracterizar a relação dose-resposta e também a escolha de doses nos estudos de exposição crônica (BARNES; DOURSON, 1988).

2.4. Reprodução e teratogênese.

Estudos de desenvolvimento – reprodução e teratogênese – relacionados com o uso de drogas até 1962 não recebiam a devida importância pelos farmacologistas e toxicologistas, e não havia preocupação com os possíveis efeitos teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos de drogas usadas na fase de gestação. Após esta data, devido à tragédia, em decorrência do uso da talidomida, pesquisas tornaram-se rotina no estudo da segurança dos medicamentos (CLARK, 1993).

O estudo dos efeitos adversos no organismo em desenvolvimento, ocorrendo a qualquer hora durante a vida do organismo, que é resultado da exposição a agentes químicos ou físicos antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade, é denominado como toxicologia do desenvolvimento (SCHWERTZ et al., 1991).

As drogas podem interferir em diversos processos de reprodução, não só causando malformações e matando o embrião, como também, bloqueando a gametogênese e evitando a fertilização. Os estudos das ações das drogas sobre as diversas fases do processo reprodutor visam identificar os efeitos sobre a fertilidade, o transporte e a implantação do ovo no útero, a embriogênese e a organogênese, o parto, o recém-nascido, a lactação, o desmame e o cuidado da mãe com a prole, anormalidades pós-natais, comportamento sexual, os ciclos estral e menstrual, ritmos de concepção e funções placentárias e uterinas (SCHWERTZ et al., 1991).

O período teratogênico maior situa-se na embriogênese, período este que, em ratos, está compreendido do 7º ao 15º dia de gestação. É neste período que se observa diferenciação sexual e organogênese. É possível também que o desenvolvimento no período pós-natal possa ser alterado em termos estruturais e metabólicos por compostos administrados no período pré-natal. Malformações podem ser causadas pela ação direta da droga sobre o feto, ou, secundariamente, através da ação sobre o organismo (MENEGOLA et al., 1998).

O período pré-natal caracteriza-se por intensa histogênese e citodiferenciação dos órgãos já formados sendo uma fase altamente vulnerável para o desenvolvimento microestrutural do cérebro e do sistema imunológico. Drogas administradas no período perinatal, no tratamento da gravidez de risco ou de neonatos de risco podem levar a mudanças no processo de desenvolvimento e iniciar desordens na rede neural e na comunicação celular. Estas alterações podem não ser evidentes no nascimento, mas servem de base para vários defeitos funcionais de competência neuro-psico-imunológica as quais se tornariam gradualmente evidentes durante o amadurecimento e na idade adulta (BENESOVÁ, 1995).

2.5. Drogas na gestação.

Na gravidez e lactação a segurança quanto ao uso de drogas deve ser levada ao extremo. A transferência de drogas, através da placenta e leite é potencialmente deletéria para o embrião, feto ou lactente. Certas drogas como os folatos e primaquina, podem penetrar na circulação fetal. O quinino em grandes doses pode provocar aborto. A pirimetamina em pequenas doses parece ser segura na gravidez, mas em doses elevadas tem risco potencial de lesão fetal teratogênica (BEDRAN, 1988).

De acordo com a sensibilidade aos agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, a gestação pode ser dividida em três fases: a primeira, conhecida como pré-implantação, compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto. Nos seres humanos, esse período vai até o 17º dia de gestação, enquanto em ratos vai até o 6º dia, aproximadamente. A segunda fase, a organogênese, na espécie humana vai do 18º ao 40º dia de gestação e nos ratos, do 7º ao 14º dia. A última fase, conhecida como período fetal, vai até o término da gestação que nos ratos dura em média do 15º ao 21º dia (ALMEIDA et al., 2000).

No período de pré-implantação, o embrião é bastante resistente à teratogênese, encontra-se com células totipotentes em divisão, sem que haja acréscimo citoplasmático (FRITZ et al., 1990; ALMEIDA et al., 2000). Após a implantação, o embrião inicia o período de organogênese, que é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo. É o período de maior susceptibilidade à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, no qual o maior número de malformações pode ser induzido (BRENT et al., 1993). O período fetal tem início com o fim da organogênese e é caracterizada por diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto (FRITZ et al., 1990). A sensibilidade às malformações anatômicas durante essa fase é baixa, porém a exposição aos agentes químicos pode produzir morte celular, inibição da

diferenciação e da divisão celular, interferência na formação dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, promovendo desordens funcionais e de comportamento (AROUX et al., 1997).

Há várias plantas que tiveram sua toxicidade reprodutiva comprovada através de estudos em roedores. Das sementes de melãozinho (*Momordica charantia* L. - *Cucurbitaceae*) foram isoladas glicoproteínas (alfa e beta- momorcharina) com ação abortiva em camundongos e ação inibitória sobre a multiplicação celular no endométrio e miométrio (CHAN et al., 1985). A arruda (*Ruta graveolens* L. – *Rutaceae*) demonstrou uma atividade antifertilidade para as suas partes aéreas moídas e seus extratos aquosos (GANDHI et al., 1991). A administração de diferentes extratos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L. – *Euphorbiaceae*) em ratas prenhes acarretou reabsorção fetal nas mesmas (GOONASEKERA et al., 1995). Com o boldo-do-chile (*Peumus boldus* Mol. – *Monimiaceae*) ações abortiva e teratogênica foram evidenciadas para o extrato hidroalcoólico das suas folhas secas e também para o alcalóide boldina, considerado um dos seus principais componentes (ALMEIDA et al., 2000).

2.6. Droga e o embrião.

A droga após ser administrada é incorporada à circulação materna para só depois se difundir na circulação do embrião. Fatores como, a natureza da substância, a dose usada, condição de troca entre a mãe e o concepto, são de grande relevância. A placenta, que se encontra entre estes dois, atua intermediando essas trocas, ativa ou passivamente, como um órgão regulador. As substâncias que passam ficam armazenadas no concepto (GANAPATHY et al., 1999).

A placenta atua como uma barreira que tem tanto a capacidade de restringir como de facilitar a passagem de drogas para a circulação fetal. As drogas que têm a capacidade de atravessá-la têm as características semelhantes as que atravessam a barreira hematoencefálica, são substâncias lipofílicas, não polares e tamanho inferior a 1000Å (ADLER, 1994).

Na fase luteínica o blastocisto tem de atravessar as trompas até chegar ao útero, ambos preenchidos por suas respectivas secreções. Drogas como o fenobarbital, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol e a fenitoína, por exemplo, têm a capacidade de alterar a composição destas secreções dificultando o transcurso do blastocisto (ADLER, 1994).

Após implantação do blastocisto no útero (nidação) sua nutrição passa a ser chamada de histiotrófica, onde a participação da circulação materna é modesta, mas os efeitos de drogas já difundidas nesta circulação são mais acentuados, pois, estas atingem diretamente os tecidos ovulares por meio de mecanismos como pinocitose, difusão facilitada, difusão simples, transporte ativo ou fissuras. Substâncias conhecidas, como por exemplo, isoniazida, cafeína, pentobarbital, DDT

(dicloro-difenil-tricloroetano) e nicotina, podem ser encontradas em concentrações duas vezes maiores no blastocisto do que na circulação materna (ADLER, 1994).

A barreira placentária tem também uma função metabólica, comparada a do fígado, onde muitas drogas são metabolizadas ao nível do trofoblasto. Reações de oxidação aromática são realizadas na placenta (ADLER, 1994).

O estudo da transferência placentária de substâncias estranhas tem como finalidade caracterizar os efeitos que estas possam exercer no feto. Por exemplo, a teratogenicidade da talidomida dá-se devido a metabólitos de natureza polar produzidos pela sua metabolização na placenta, estes que atravessam esta barreira alcançando o feto (ADLER, 1994).

2.7. Sede - regulação do manejo da água e do sódio (Na^+).

Os fluidos corporais apresentam uma osmolaridade de aproximadamente 290 mosm/kg. Se a osmolaridade subir, por exemplo, em virtude da perda de água, a consequência seria o efluxo de água do meio intracelular, pois este se encontra em equilíbrio osmótico com o meio extracelular. Para proteger a célula de maiores oscilações de volume, a osmolaridade do meio extracelular deve ser rigorosamente regulada. Os principais envolvidos nessa regulação são os osmoceptores (especialmente no hipotálamo), o hormônio antidiurético (HAD = vasopressina) e os rins, os órgãos alvo desse hormônio (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

Quando as perdas de água do corpo (por exemplo, pela urina) são compensadas insuficientemente ou não são compensadas, o meio extracelular se torna hipertônico: a elevação de apenas 1% da osmolaridade (3 mosm/kg) é suficiente para secreção do HAD dos lobos posteriores da hipófise. O HAD reduz a eliminação de água (figura 4). O líquido, igualmente hipertônico, desencadeia a sede hiperosmótica via osmoceptores centrais no hipotálamo, a qual estimula a reposição de água do corpo. O hipotálamo é informado sobre os deslocamentos da água no trato gastrointestinal por osmoceptores periféricos na região da veia porta e por aferências do nervo vago (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

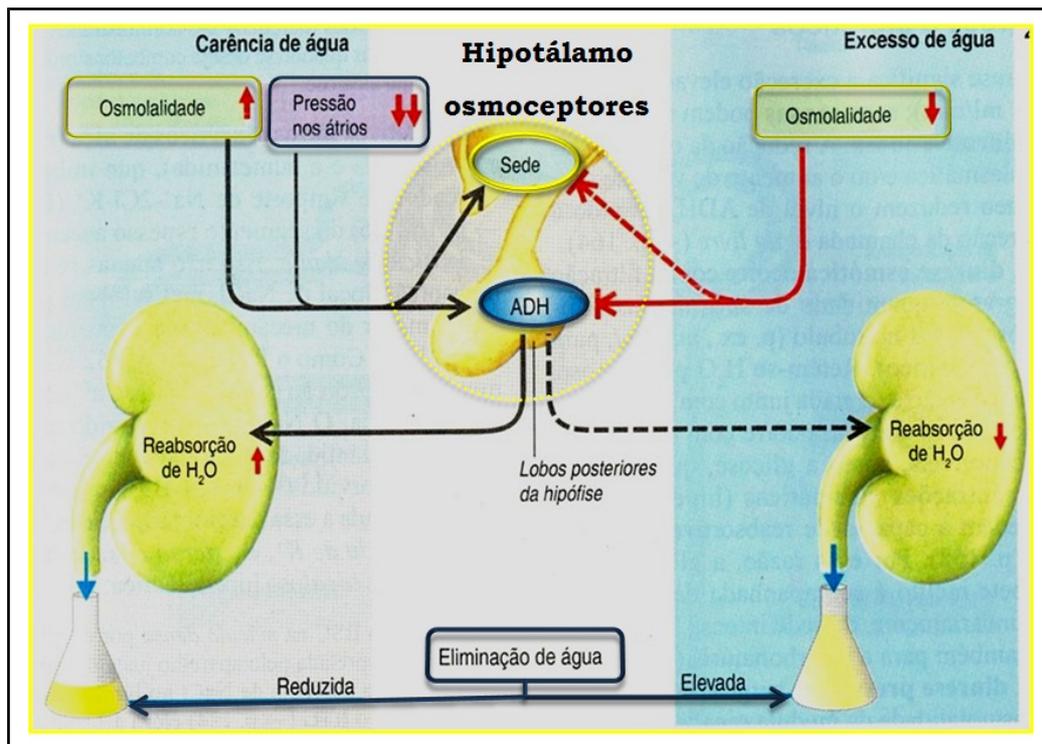


Figura 4: Sede - Regulação do manejo da água e do sódio (Na^+). ADH – hormônio antidiurético.
Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

2.8. Regulação do volume de água corporal.

Segundo Silbernagl e Despopoulos (2003), a ingestão de NaCl é de cerca de 8 a 15 g/dia. Essa mesma quantidade/tempo tem de ser excretada pelos rins para que o conteúdo de Na^+ do corpo se mantenha constante e, com isso, o conteúdo de Na^+ do meio extracelular, que é fortemente dependente do primeiro. Estão envolvidos nessa regulação de volume (Figura 4):

- O sistema renina-angiotensina – sua ativação provoca, via angiotensina II (AT II - redução da taxa de filtração glomerular) e aldosterona, a retenção de Na^+ ;
- A atriopeptina (ANP – peptídeo natriurético atrial). É excretada pelas células dos átrios cardíacos quando o meio extracelular se expande (e a pressão nos átrios se eleva). A atriopeptina intensifica a excreção de Na^+ elevando a fração de filtração e inibindo a reabsorção de NaCl do ducto coletor;
- Hormônio antidiurético (HAD – ADH) – a secreção deste hormônio é estimulada pela elevação da osmolalidade; quando os sensores de estiramento do átrio quando enviam sinais de redução (de mais de 10%) do meio extracelular (~ pressão atrial) ao hipotálamo (reflexo de Gauer-Henry);

- A diurese pressória que intensifica a excreção de Na^+ e água é desencadeada pelo aumento da pressão arterial quando o volume do meio extracelular se eleva;
- Carência de sal – se em princípio, o conteúdo de água do organismo é normal, a diminuição da osmolalidade do sangue devido a uma hiponatremia provoca a redução da secreção do hormônio antidiurético, de forma que a excreção de água aumenta. O meio extracelular e, portanto, também o volume plasmático e a pressão arterial reduzem. Isso ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona que desencadeia a sede hipovolêmica por meio da angiotensina II e, via aldosterona, retém o Na^+ . Por fim, com a retenção de sal, a água também é retida (via elevação do hormônio antidiurético); além disso, ocorre a ingestão de água, de forma que o volume do meio extracelular normaliza novamente;
- Excesso de sal – se o conteúdo de água é normal se eleva a osmolalidade do plasma (sede) e a excreção do hormônio antidiurético (retenção de água). Com isso, cresce o meio extracelular, e o sistema renina-angiotensina é freado. Além disso, a atriopeptina provoca o aumento de excreção de NaCl e água normalizando o meio extracelular.

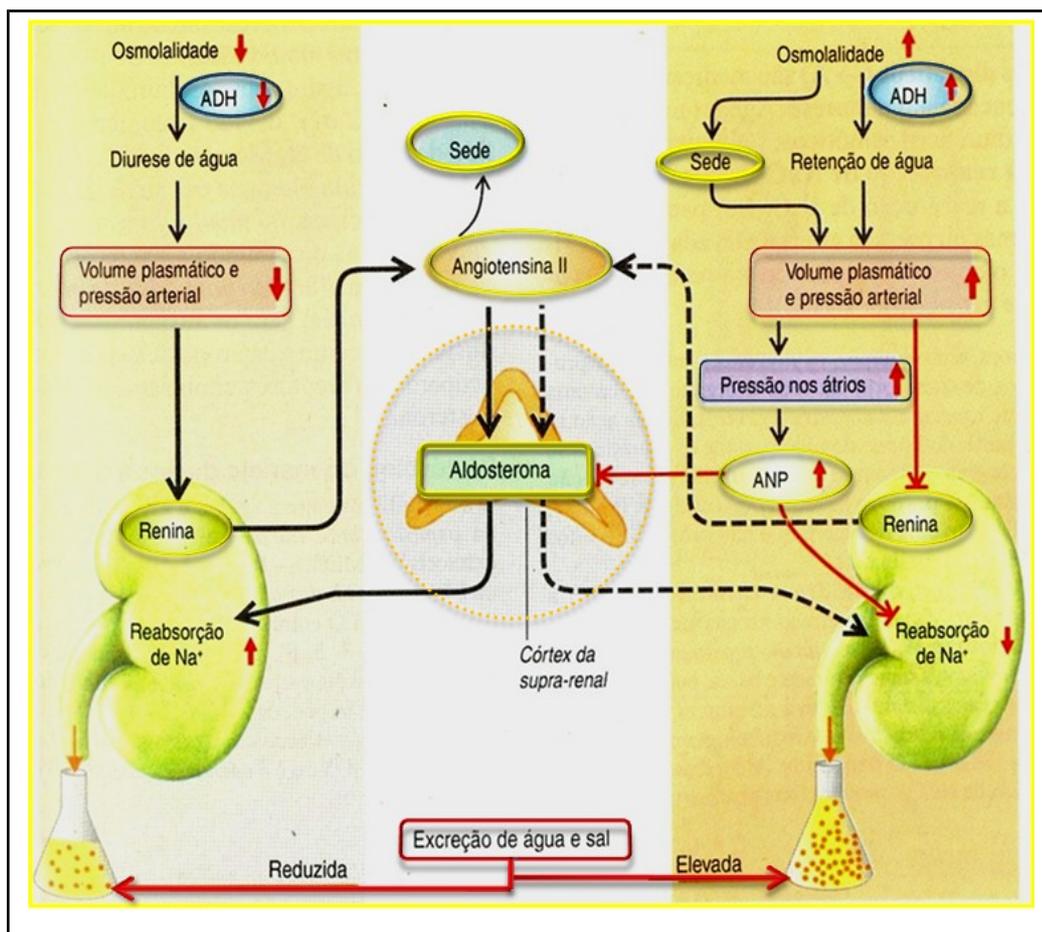


Figura 5: Regulação do volume de água corporal. ADH – hormônio antidiurético; ANP – atriopeptina.
Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

2.9. Regulação da concentração extracelular do potássio (K^+).

Por dia, são absorvidos cerca de 100 mmol de K^+ (quantidade mínima necessária: 25 mmol/dia), dos quais são 90% são excretados com a urina e 10% com as fezes. A concentração plasmática de K^+ é de 3,5 a 4,8 mmol/L, enquanto nas células (mediante a atividade da ATPase de Na^+-K^+) a concentração de K^+ é superior a 30 vezes; assim, 98% dos cerca de 3.000 mmol de íons do corpo encontram-se nas células. Embora perfaça apenas 2% do total, o K^+ extracelular exerce um papel relevante, pois: a) nele se baseia a regulação do no K^+ organismo; b) alterações relativamente pequenas do K^+ celular (influxo e efluxo) podem causar oscilações extremas da concentração plasmática (risco de arritmias cardíacas, por exemplo). Assim, devem fazer parte da regulação da homeostase do K^+ tanto a distribuição entre os meios intracelular e extracelular quanto o equilíbrio entre a absorção e a excreção do K^+ (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

A regulação aguda da concentração extracelular de K^+ ocorre com o movimento do K^+ dentro do organismo entre o meio extracelular e o intracelular (Figura 6). Esse processo relativamente rápido impede ou suaviza, por exemplo, a elevação crítica do K^+ no meio extracelular quando maiores quantidades de K^+ entram no organismo (alimentação) ou são liberadas intensamente (em razão de hemólise súbita, por exemplo). Esse movimento do K^+ tem regulação hormonal. Assim, a insulina secretada após a alimentação de alimentos estimula a Na^+-K^+ ATPase e distribui, com isso, o K^+ ingerido (das células animais e vegetais dos alimentos) entre as células do organismo. A adrenalina eleva a captação celular de K^+ de maneira semelhante, o que tem especial importância durante o trabalho muscular ou o trauma, quando há uma descarga elevada de K^+ no plasma. Em ambos os casos, o nível de adrenalina leva a captação do K^+ nessas e em outras células. A regulação crônica do balanço do K^+ com o meio externo é executada principalmente pelos rins (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

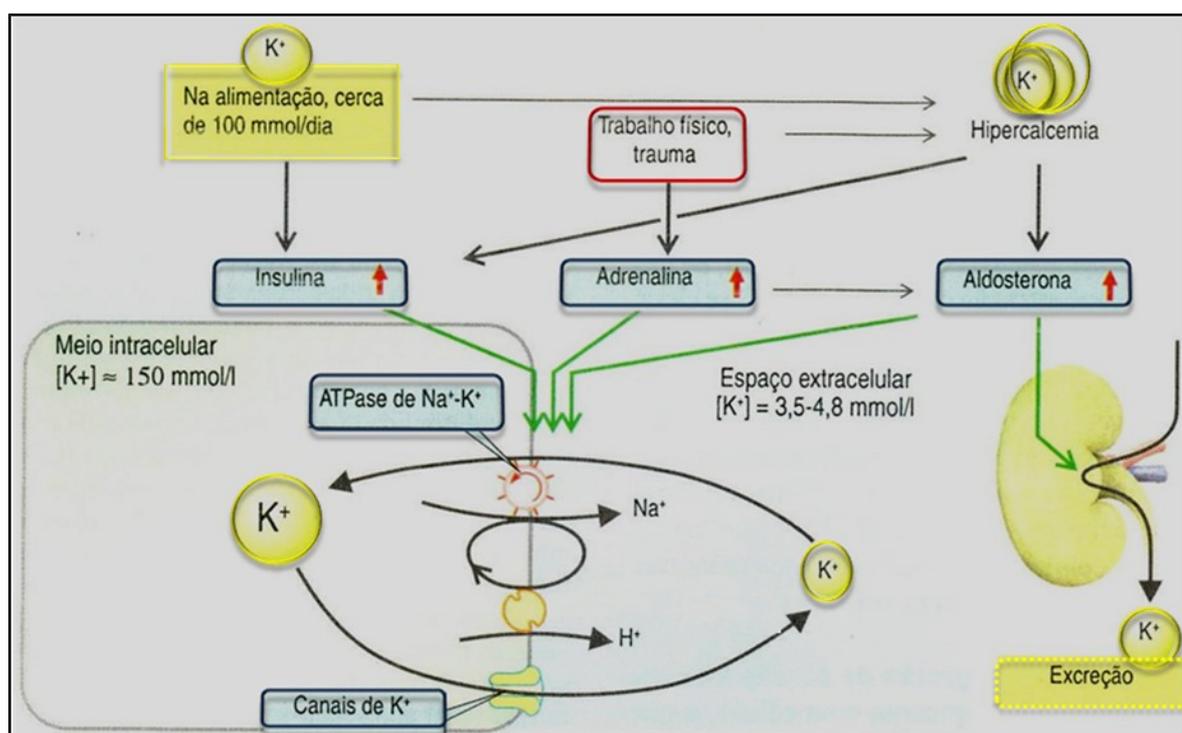


Figura 6: Regulação da concentração extracelular do potássio (K^+).

Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

As alterações de pH influenciam a distribuição do K^+ entre o plasma e as células, pois o antiporte ubíquo de Na^+/K^+ ocorre mais rapidamente e mais lentamente na alcalose. Por isso, na acidose, reduz-se o influxo de Na^+ , a ATPase de Na^+-K^+ é mais lenta e a concentração extracelular de K^+ eleva-se (de modo intenso nas acidoses metabólicas, especificamente 0,6 mmol/L para cada alteração do pH em 0,1 unidade) (Figura 7). Nas alcaloses ocorre diminuição do K^+ extracelular (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

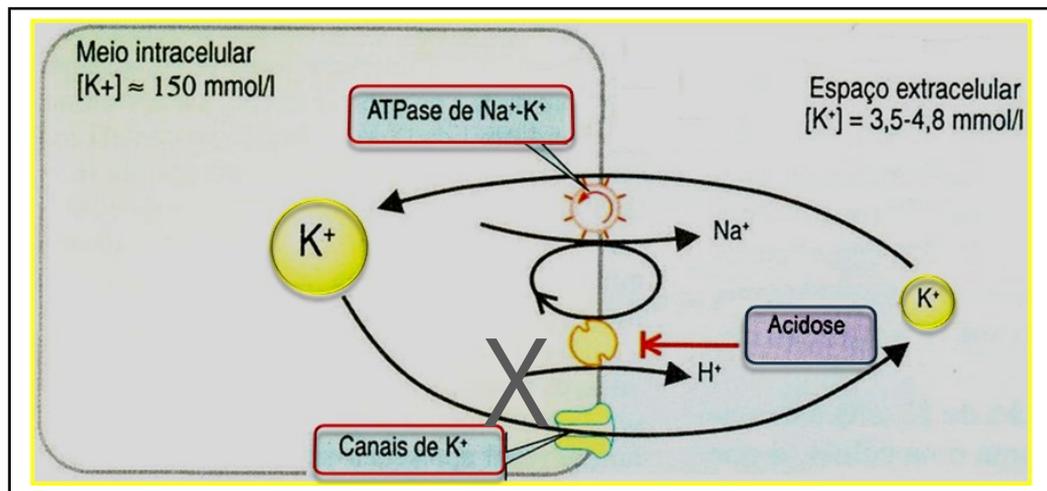


Figura 7: Acidose e a regulação da concentração extracelular do potássio (K^+).
Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

Objetivos.

3 OBJETIVOS.

3.1. Geral.

Avaliar a segurança de uso por via oral do óleo de *C. multijuga* Hayne em doses repetidas durante oito semanas.

3.2. Específicos.

- ❖ Caracterizar os principais componentes do óleo-resina de copaíba;
- ❖ Confirmar o efeito antinociceptivo e antiinflamatório do óleo-resina de copaíba nos modelos de contorções abdominais por ácido acético e pleurisia induzida por carragenina;
- ❖ Estimar o valor da toxicidade aguda (DL₅₀) do óleo-resina de copaíba por via oral em ratos;
- ❖ Investigar o efeito da administração oral de doses repetidas (30 dias) do óleo-resina de copaíba sob os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e coelho Nova Zelândia;
- ❖ Estudar o efeito do tratamento sub-crônico (30 dias) por via oral do óleo-resina de copaíba sobre a morfologia macro e microscópica dos tecidos.
- ❖ Compreender o efeito da administração por via oral do óleo-resina de copaíba durante o período de gestação em ratas Wistar e o desenvolvimento da prole.
- ❖ Identificar o efeito da administração sub-crônica por via oral do óleo-resina de copaíba sobre a performance reprodutiva de ratos Wistar e desenvolvimento da prole.
- ❖ Explorar o efeito da administração oral de doses repetidas (30 dias) do óleo-resina de copaíba sobre a função renal em ratos.

Material e método.

4 MATERIAL E MÉTODO.

4.1. Material vegetal.

A espécie de planta foi coletada em seu habitat natural, na região amazônica (Nhamundá – AM), Brasil (S 02°11'09" W 56°42'46"), em abril de 2009. O espécime comprovante da planta (*Copaifera multijuga* Hayne - *Fabaceae*) foi identificada pelo botânico Ramos, J.F. e depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA, sob o número 233154/2009 (ANEXOS). O óleo de *C. multijuga* foi cedido pela empresa Pronatus, Manaus (AM), Brasil. A densidade deste óleo (0,9445 g/mL) foi determinada segundo métodos gerais da Farmacopéia Brasileira V, vol.1, p.86, 2010, a fim de calcular os volumes a serem administrados aos animais.

4.2. Análise química do óleo de *C. multijuga* por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/EM).

A análise do óleo de copaíba foi realizada pelo Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental (UFPE) em um cromatógrafo gasoso *Agilent 7890A* acoplado a um espectrômetro de massa *Agilent MSD 5975C* equipado com coluna *Agilent HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane* (30 m x 250 µm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1 mL por minuto. A temperatura inicial do forno foi de 40°C (mantida por 1 minuto), aumentada até 105°C a uma taxa de 50°C/min, em seguida elevada a 150°C a uma taxa de 1,5°C/min e por fim aumentada até 280°C a uma taxa de 30°C/min. A coluna foi mantida na temperatura final por 10 minutos para garantir a eluição de todos os componentes. O injetor foi mantido a 270°C e usado no modo Split 1:50. A fonte de ionização foi mantida a 230°C e o potencial de ionização foi de 70eV. Os índices de retenção (IR) foram determinados para os componentes do óleo pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C8 a C30) e subsequente aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963). Os constituintes foram inicialmente identificados pela comparação dos valores de IR calculados com aqueles publicados na literatura (ADAMS, 2007). As identidades foram confirmadas pela comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles encontrados nas bibliotecas NIST, *Adams* e *MassFinder4* do GCMS e outros dados publicados na literatura.

4.3. Animais.

Foram utilizados ratos, fêmeas e machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar pesando 200-240g, e 310-340g, respectivamente; camundongos machos (*Mus musculus*) pesando 25-35g que foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, e coelhos albinos de ambos os sexos (*Oryctolagus cuniculus*), linhagem Nova Zelândia, pesando 600-1100 g, oriundos de fonte comercial. Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas (cinco por gaiola) e mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo claro-escuro 12h) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), recebendo água e dieta (Presence[®] para ratos e camundongos e ração Purina natural[®] para coelho) *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal Pernambuco sob os processos, nº 027253 e 051674 (ANEXOS).

4.4. Avaliação da atividade antinociceptiva do óleo de *C. multijuga* (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) por contorções abdominais em camundongos.

Cinco grupos de animais (n = 6/grupo) foram colocados para ambientação em câmara adequada por cinco minutos, depois de decorrido este tempo os animais do grupo controle negativo (água - 10 mL/kg), do grupo controle positivo (indometacina 10 mg/kg) e os grupos (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) foram tratados (via oral) e após 60 minutos receberam ácido acético 1,6% em solução de NaCl 0,9% 1 mL/kg por via intraperitoneal. As contorções abdominais (contrações da parede abdominal seguida de torções do tronco e extensão dos membros posteriores) foram registradas durante 30 minutos (KOSTER, 1959) (Figura 8). Os resultados foram expressos como média do percentual de contorções (número de contorções do animal x 100/média do número de contorções do grupo controle negativo) e média do percentual de inibição (100 – percentual de contorções do animal) (ANJOS et al., 2008).

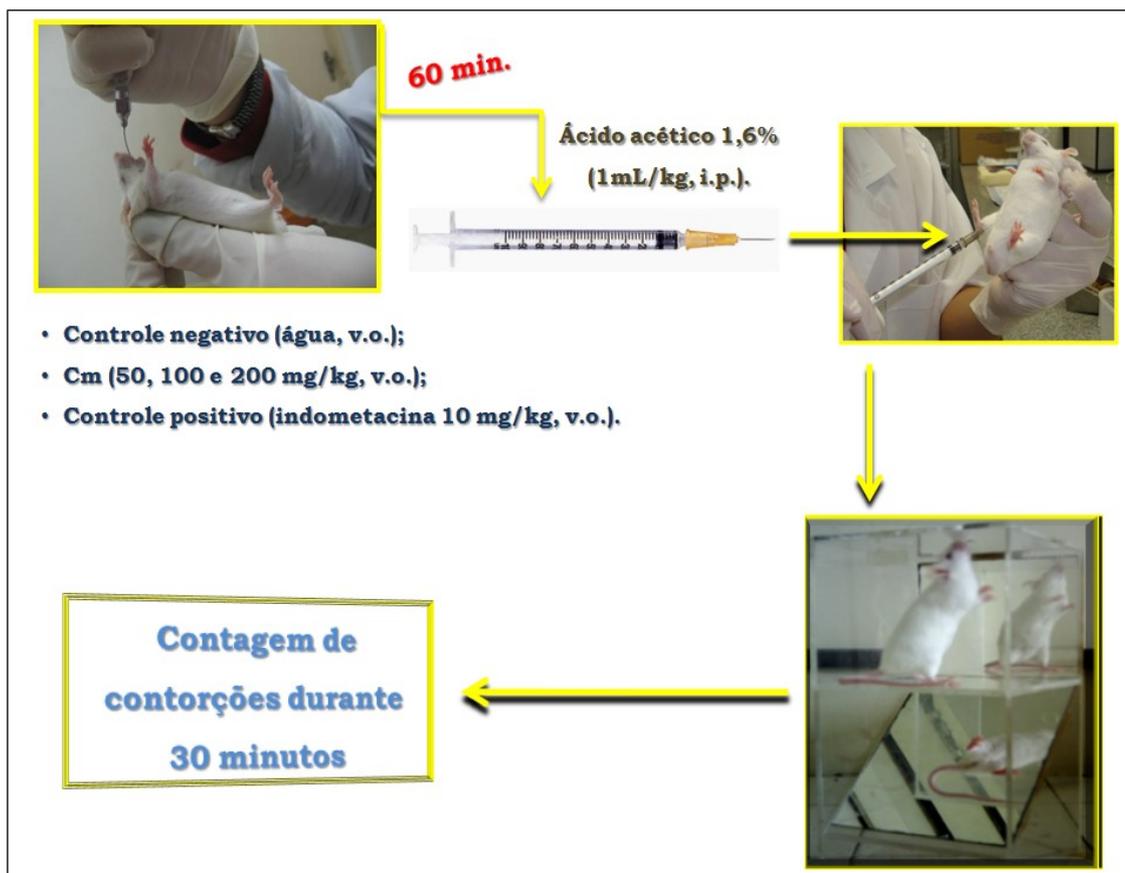


Figura 8. Modelo da metodologia de contorções abdominais.

4.5. Avaliação do efeito antiinflamatório agudo – peritonite - do óleo de *C. multijuga* (Cm 200 mg/kg) em camundongos.

Três grupos de animais (n = 6/grupo) foram tratados com água (10 mL/kg) como controle negativo, dexametasona 1 mg/kg, controle positivo e Cm 200 mg/kg por via oral. Decorridos 60 minutos, estes animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0,25 mL de carragenina 1%. Depois de tratados os animais foram devolvidos às gaiolas e deixados com livre acesso à ração e à água durante cinco horas. Após este tempo, estes animais foram inicialmente anestesiados e em seguida eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com pentobarbital (0,140 g/kg, i.p.). Para facilitar a coleta, todos os animais receberam injeção de 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) heparinizado (5 UI/mL) pH 7,2 massageando-se o abdômen para soltar as células nele aderidas. O exsudato peritoneal foi coletado com pipeta Pasteur plástica através de laparoscopia abdominal. Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída em líquido de Türk e as células contadas em câmara de Neubauer (FERRÁNDIZ; ALCATAZ, 1991) (Figura 9).

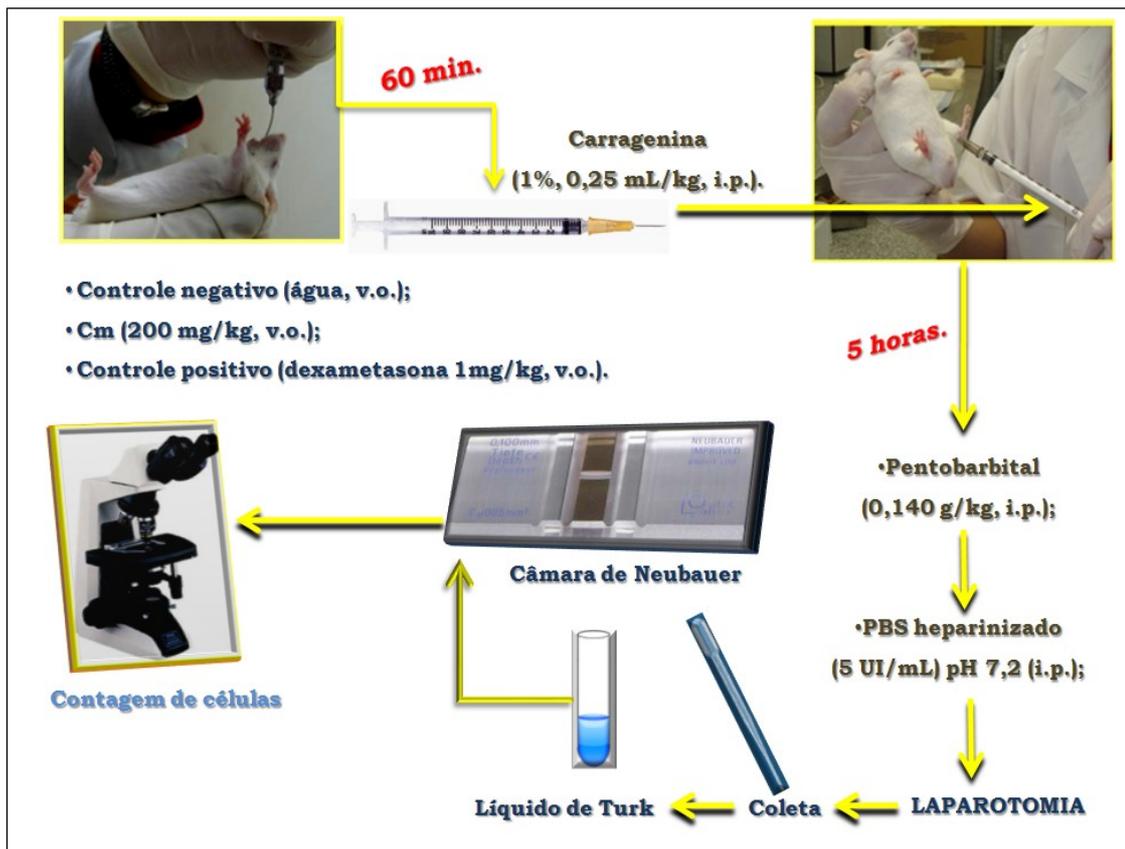


Figura 9. Modelo da metodologia de indução de inflamação aguda (peritonite).

4.6. Toxicidade Aguda.

Dois grupos de ratos de ambos os sexos ($n=3/\text{grupo}$) foram privados de ração por 12 h e em seguida receberam o óleo-resina de copaíba (4g/kg) ou água (controle) por via oral. Após a administração, os animais foram observados individualmente durante os primeiros 30 minutos e a cada hora durante as primeiras 6 h e diariamente por um período de até 14 dias. Os animais foram observados diariamente quanto ao consumo de ração e água, alterações gerais de comportamento e sinais clínicos de toxicidade (MALONE, 1977). O experimento foi repetido utilizando uma dose menor até que não se registrasse morte.

4.7. Toxicidade de dose repetida.

4.7.1. Avaliações dos efeitos da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) em ratos de ambos os sexos.

Quarenta ratas e quarenta ratos foram divididos em quatro grupos cada (n=10/grupo). O grupo controle recebeu água e os grupos tratados receberam respectivamente óleo de *C. multijuga* (Cm) nas doses de 200, 500 e 2500 mg/kg por um período de oito semanas. Os animais foram observados diariamente quanto aos sinais toxicidade (piloereção, diarreia e alteração de comportamento e da atividade locomotora) e tiveram o ganho de massa corporal registrado semanalmente, bem como o consumo de ração e água diariamente (SILVA et al., 2007).

4.7.2. Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Ao final da quarta e oitava semana de tratamento, os ratos foram submetidos a um jejum de 12h com livre acesso à água e, em seguida, sob anestesia por pentobarbital (0,035 g/kg, i.p.), procedeu-se a coleta de sangue, por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de um capilar (WAYNFORTH, 1980). O sangue coletado dos animais foi acondicionado em tubo de coleta com o anticoagulante ácido etileno diaminotetraacético (EDTA), para as análises hematológicas, e tubo com gel separador para a obtenção de soro para as determinações bioquímicas.

O hemograma completo (número de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos - volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) foi realizado imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas. Já para a análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e em seguida determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), amilase, fosfatase alcalina, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total, direta e indireta, proteínas totais, albumina, amilase e desidrogenase lática. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Architect (Abbott®) com sistemas comerciais da Boehringer Ingelheim®.

4.7.3. Estudo morfológico.

Ao final da oitava semana de tratamento, os ratos inicialmente foram anestesiados e em seguida eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com pentobarbital (0,140 g/kg, i.p.). Foi feita necrópsia para avaliação externa de coração, fígado, rins, pulmões, baço, estômago, intestino delgado, glândula adrenal, cérebro, ovário, útero, testículo, epidídimo, canal deferente e vesícula seminal estes órgãos foram removidos e pesados individualmente. O ducto deferente e a vesícula seminal foram pesados sem fluido. O peso dos órgãos foi expresso em termos de peso absoluto (g) e peso relativo (g/100 g de peso corporal). Para análise microscópica, os órgãos foram fixados "*in totum*" em 10% de formalina tamponada durante 48 horas à temperatura ambiente, após a fixação de cada amostra foi lavada com água e imersa em álcool etílico a 70% durante 3 a 4 dias, e depois foram impregnadas e incluídas em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5 µm, os quais foram corados pela hematoxilina/eosina (H.E) (LISON, 1960) e posteriormente analisadas por meio de um sistema para capturar imagens MicroDIP/Kacil®

4.8. Avaliação das variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento de ratas durante a prenhez (1º ao 20º dia).

Ratos machos adultos não tratados foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 5/grupo) e foram transferidos para gaiolas individuais onde foram acasalados com fêmeas não tratadas e férteis (n = 10/grupo) durante o estro natural (sexualmente receptiva) durante 5 dias (macho : fêmea na razão, 1:2). A presença de tampão vaginal e espermatozóides no esfregaço vaginal na manhã seguinte, foram definidos com o primeiro dia de prenhez, onde a partir deste dia estes grupos foram tratados por via oral com água (controle) e óleo de *C. multijuga* 200, 500 e 2500 mg/kg até o 20º dia de prenhez (ALMEIDA, 2000). Durante a prenhez, as ratas foram cuidadosamente observadas duas vezes ao dia para a existência de mudanças na aparência, comportamento, piloereção, perda de pêlos, diarreia, modificações na atividade locomotora, sinais de sangramento vaginal e a mortalidade ao longo do período experimental. Foi medido o consumo de ração, água e o peso dos animais no início e ao final da prenhez e nos 7º, 14º e 20º dia. No 20º dia as ratas foram anestesiadas e em seguida eutanasiadas por aprofundamento do plano anestésico com pentobarbital (0,140 g/kg, i.p.). e após laparotomia foi observado a presença ou não de malformação fetal, número de fetos vivos, número de fetos mortos, relação feto/mãe, massa absoluta dos fetos (g), massa relativa dos fetos (g/100g), comprimento dos fetos (cm), massa absoluta das placentas (g), massa relativa das placentas (g/100g), massa absoluta dos ovários (mg),

massa relativa dos ovários (mg/100g), número de implantações, número de implantações viáveis, número de reabsorção, número de corpos lúteos, índice de reabsorção (número de reabsorções x 100/número de implantes), índice de implantação (número total de sítios de implantações/número total de corpos lúteos x 100), perda pré-implantação (número de corpos lúteos – número de implantações/número de corpos lúteos x 100) e perda pós-implantação (número de implantações – número de fetos vivos/número de implantações x 100) (COSTA-SILVA et al., 2006).

4.9. Avaliação das variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Ratos machos adultos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 5/\text{grupo}$) e, em seguida, tratadas por via oral com *C. multijuga* (nas doses de 200, 500 ou 2500 mg/kg) ou água (controle), durante oito semanas consecutivas. Durante o tratamento, o peso corporal foi registrado semanalmente, e o consumo de ração e água a cada dois dias. Os animais foram observados duas vezes ao dia quanto a sinais de toxicidade, tais como a piloereção, a perda de pêlos, diarreia e modificações na atividade locomotora e a mortalidade ao longo do período experimental. Em seguida, eles foram transferidos para gaiolas individuais e foram acasalados com fêmeas não tratadas e férteis ($n = 10/\text{grupo}$) durante o estro natural (sexualmente receptiva) durante 5 dias (macho : fêmea na razão, 1:2). A presença de tampão vaginal e espermatozoides no esfregaço vaginal na manhã seguinte, foram definidos o primeiro dia de gestação. Ratas prenhes chegaram ao parto a termo. Durante a prenhez, as ratas foram cuidadosamente observadas duas vezes ao dia para a existência de mudanças na aparência, comportamento e sinais de sangramento vaginal. O dia do parto foi designado como dia 1 de vida pós-natal. No dia 4 de vida pós-natal, ninhadas foram abatidos a sete recém-nascidos. Nos casos em que nasceram menos de sete filhotes neonatos adicionais foram promovidos de outras ninhadas. Após o nascimento foram analisados os seguintes parâmetros reprodutivos: duração da gestação (dia), número de fetos vivos e mortos, a relação de prole/mãe, o índice de fertilidade (número de ratas prenhes/número de fêmeas acasaladas x 100), o índice de viabilidade (número de filhotes vivos no dia 4 de vida pós-natal/número de filhos nascidos vivos x 100), o índice de lactação (número de filhotes vivos no dia 21 de vida pós-natal/número de filhotes vivos no dia 4 de vida pós-natal x 100). Peso corporal (g) e comprimento (cm) dos ratos recém-nascidos foi determinado nos dias 1, 4, 7, 14 e 21 de vida pós-natal. Os filhotes foram cuidadosamente observados para qualquer malformação externa (SILVA et al., 2009).

4.9.1 Avaliação dos parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Após o nascimento, um terço da prole de cada grupo foi analisado para os seguintes parâmetros comportamentais: reflexo postural, dia da abertura dos olhos, dia de andar adulto e deambulação espontânea. Reflexos posturais dos filhotes foram avaliados nos 1º e 7º dia de vida. Os filhotes foram colocados em uma superfície plana, em decúbito dorsal, e o reflexo de endireitamento foi medido em segundos. O dia da abertura do olho foi determinada pela observação da deslocação parcial da fenda palpebral em pelo menos um olho. Foi considerado dia do andar adulto quando filhotes deambularam sem arrastar patas traseiras e sem tocar sua barriga no chão. A deambulação espontânea foi determinada em 20 dias de vida pós-natal através de um quadrado de 30 x 30 cm e dividido em nove espaços iguais. O filhote foi colocado na parte central e durante dois minutos foi contado o número de quadrados invadidos (quando o filhote colocava pelo menos três patas no quadrado) (COSTA-SILVA et al., 2006).

4.10. Avaliação da função renal.

4.10.1. Análise dos parâmetros bioquímicos em coelhos Nova Zelândia adultos de ambos os sexos tratados via oral por quatro semanas com o óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg).

Dez coelhas e dez coelhos foram divididos em dois grupos cada (n=5/grupo). O grupo controle recebeu água e o grupo tratado óleo de *C. multijuga* (Cm) por via oral na dose de 2500 mg/kg por quatro semanas. Ao final do tratamento os animais foram submetidos a jejum de 12h com livre acesso à água, e depois de decorrido este tempo foram imobilizados em caixa de contenção especial e procedeu-se a coleta de sangue por venopunção nas veias marginal e/ou central do pavilhão auricular, segundo Taborda et al. (2004).

4.10.2. Avaliação da função renal em ratos tratados por via oral com o óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) durante quatro semanas.

Dez ratas e dez ratos foram pesados e divididos em dois grupos cada (n=5/grupo). O grupo controle recebeu água e o grupo tratado óleo de *C. multijuga* Hayne (Cm) por via oral na dose de 2500 mg/kg por quatro semanas. Ao final deste período os animais foram condicionados

isoladamente em gaiolas metabólicas (figura 10), gaiola individual que permite mensuração de variáveis biológicas (DEZOTI et al., 2009), e passaram por um tempo de três dias de adaptação ao local com o tratamento em continuação. Durante 24 horas decorrentes do tempo zero os animais tiveram acesso livre à água e a urina foi coletada, sendo os animais pesados novamente. Foi calculado por grupo a média do volume de urina em 24 horas, a média do consumo de água em 24 horas, a média da massa corporal dos grupos em 30 dias (g), média da massa corporal (Δ final - inicial, g) (DEZOTI et al., 2005), área de superfície corporal 30 dias ($11 \times$ massa corporal^{0,631}, cm²) e área de superfície corporal (Δ final - inicial, cm²) (BARBOSA et al., 2003).

Os animais foram submetidos a jejum de 12h até o tempo 24 horas onde se aferiu a quantidade de água ingerida por animal, em seguida, sob anestesia por pentobarbital intraperitoneal (0,035 g/kg, i.p.), procedeu-se a coleta de sangue, por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de um tubo capilar (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi coletado em tubos com gel separador para análise bioquímica dos seguintes parâmetros: aldosterona, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina/globulina, vasopressina, amilase, cloro, potássio, magnésio, sódio, lactato desidrogenase (LDH), creatinina, ureia, cistatina C, creatina quinase-MB (massa) (CKMB) e a estimativa de filtração glomerular (eRFG) e em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a análise da osmolaridade e do peptídeo natriurético (BNP). Todos os tubos foram centrifugados a 3500 rotações por minuto por 10 minutos para a separação do soro.

A urina foi acondicionada em coletor de urina não estéril e posteriormente o seu volume foi medido em proveta apropriada e calculado o fluxo urinário em 24h - 1440 minutos - (volume de urina mL/1440 minutos) (DEZOTI et al., 2005), em seguida, fez-se a análise bioquímica dos seguintes parâmetros: proteínas totais, albumina, creatinina, relação albumina/creatinina, creatinina 24 horas, sódio, potássio e cloreto.

A estimativa do ritmo de filtração glomerular (eRFG) foi calculada pelo aparelho Centauro XP-7 - Siemens® pela equação de Cockcroft-Gault (1976), recomendado pela *National Kidney Education Program* (NKDEP) e pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN).

As amostras de urina e sangue foram utilizadas para a mensuração do *clearance* de creatinina pelo método Jaffé - volume de urina mL x CU/CP x tempo (minutos) - (TESHIMA et al., 2012), pela correção do *clearance* pela massa corporal (*clearance* x massa corporal, g) e pela área de superfície corporal (*clearance* x área de superfície corporal, cm²) (FERREIRA, 2006). Outros parâmetros utilizados foram a fração de excreção de sódio (FeNa = CU/CP x NaP/NaU x100) e potássio (FeK = CU/CP x KP/KU x100), sendo: CU = creatinina urinária, em mg/dL; CP = creatinina plasmática,

em mg/dL; NaP = sódio plasmático, em mEq/L; NaU = sódio urinário, em mEq/L; KP = potássio plasmático, em mEq/mL e KU = potássio urinário (DEZOTI et al., 2005).



Figura 10. Gaiola metabólica modelo 3701M081 Tecniplast®.

Análise estatística.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As variações nos dados (massa corporal, massa absoluta e relativa dos órgãos, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos, parâmetros reprodutivos, performance reprodutiva e comportamento da prole) foram verificados para homogeneidade pelo método de Bartlett. Se as variâncias foram homogêneas, os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido, se necessário, pelo teste de Newman-Keuls. Quando os dados não assumiram uma distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (índices de reabsorção, implantação, pré implantação e pós implantação). Os índices de prenhez, de viabilidade e de lactação foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Nos coelhos a diferença dos parâmetros bioquímicos entre os grupos tratados em relação ao controle foi analisada pelo teste t não pareado, também utilizado para a avaliação dos parâmetros de avaliação renal nos ratos. Um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo *GraphPad Prism 5.0*.

Resultados.

6 RESULTADOS.

6.1. Percentual dos componentes do óleo de *C. multijuga*.

A caracterização química do óleo de *C. multijuga* identificou vinte e dois componentes representando 99,11% (Tabela 1) - cromatograma em ANEXOS. Os principais compostos identificados foram os sesquiterpenos cariofileno (51,64%), copaeno (8,04%), trans- α -bergamoteno (7,57%) e germacreno D (6,22%).

Tabela 1. Percentual dos componentes do óleo de *C. multijuga*.

Peak	Compound	RI ^A	RI _{lit} ^B	Area (%)
1	α -Elemene	1338	1344	0,29
2	α -Cubebene	1350	1345	0,48
3	Copaene	1377	1374	8,04
4	β -Elemene	1394	1389	1,00
5	Cyperene	1403	1398	0,26
6	Caryophyllene	1421	1417	51,64
7	γ -Elemene	1433	1434	0,29
8	α -trans-Bergamotene	1435	1432	7,57
9	α -Humulene	1453	1452	5,93
10	Allo-aromadendrene	1460	1458	0,26
11	γ -Muuroolene	1476	1478	1,94
12	Germacrene D	1480	1484	6,22
13	β -Selinene	1486	1489	0,85
14	α -Muuroolene	1500	1500	0,53
15	β -Bisabolene	1508	1505	3,56
16	γ -Cadinene	1513	1513	0,61
17	δ -Cadinene	1522	1522	4,09
18	Germacrene B	1553	1559	1,32
19	Methylpalmitate	1929	1921	0,4
20	Methylinoleate	2098	2095	1,44
21	(x)- Octadecenoicacid, methylester	2104	-	2,29
22	Methylstearate	2129	2124	0,1
	Unidentified			0,89

^AÍndice de retenção linear na coluna capilar BP5; ^BAdams, 2007.

6.2. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) nas contorções abdominais em camundongos.

A tabela 2 mostra que houve redução significativa do número de contorções abdominais nos animais tratados com as três doses utilizadas em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 50, 100 e 200 mg/kg) e da indometacina sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de contorções	% inibição
Controle (água)	-	64,3 ± 8,0	-
Cm	50	49,0 ± 3,2*	23,8
Cm	100	52,2 ± 3,0*	18,9
Cm	200	26,2 ± 1,4*	59,3
Indometacina	10	0,3 ± 0,3*	99,5

Valores expressos como média do percentual de contorções (número de contorções do animal x 100/média do número de contorções do grupo controle negativo) e média do percentual de inibição (100 – percentual de contorções do animal), n=6 animais/grupo. * diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

6.3. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200 mg/kg) na peritonite em camundongos.

No gráfico 1 mostra que ocorreu diminuição significativa de 28,0% na contagem do número de leucócitos/mm³ nos animais que foram tratados com Cm 200 mg/kg e de 38,2% nos tratados com dexametasona 1 mg/kg em relação ao grupo controle.

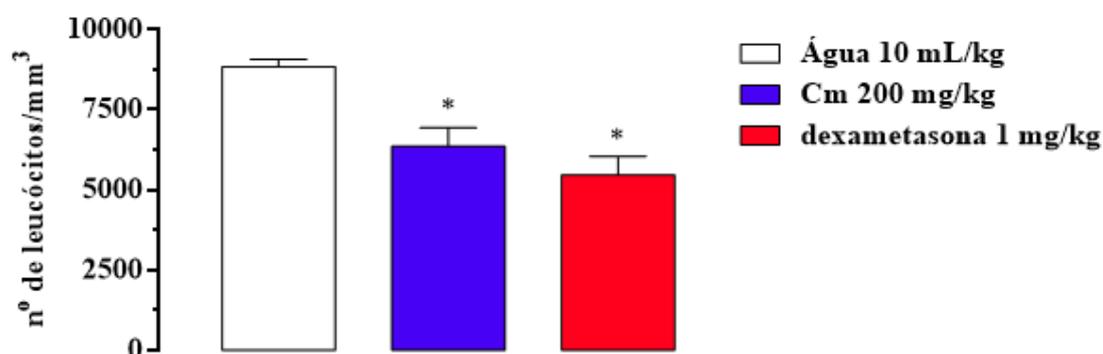


Gráfico 1: Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm) na peritonite induzida por carragenina (1%) em camundongos Swiss (n=6/grupo). * Indica diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

6.4. Toxicidade aguda.

Os resultados mostram que o óleo de copaíba até 4g/kg não produziu morte ou modificação do padrão comportamental dos animais, assim como, não houve alteração do consumo de água e ração durante o período de 14 dias de observação.

6.5. Efeito da administração em doses repetidas por via oral do óleo de *C. multijuga* (Cm) sobre os ratos.

O óleo de *C. multijuga* administrado diariamente nos ratos durante oito semanas por via oral nas doses de 200, 500 e 2500 mg/kg, não resultou em mortes entre os animais. Durante todo período de tratamento não foram observados sinais externos de toxicidade, como piloereção, alteração de comportamento, atividade locomotora e morte durante o experimento.

6.6. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm) sobre o ganho de massa e consumo de água e ração em ratos.

No gráfico 2 mostra que ocorreu aumento estatístico do ganho de massa, em relação ao grupo controle, nas ratas tratadas (Cm 200 mg/kg) na sétima semana (47,8%) bem como diminuição na oitava semana (37,4%) para o grupo Cm 2500 mg/kg. Já para o consumo de água, gráfico 3, houve aumento estatístico na oitava semana (56,8%) no grupo Cm 2500 mg/kg. Para o consumo de ração houve diminuição (18,1%) na segunda semana para o grupo Cm 2500 mg/kg (Gráfico 3).

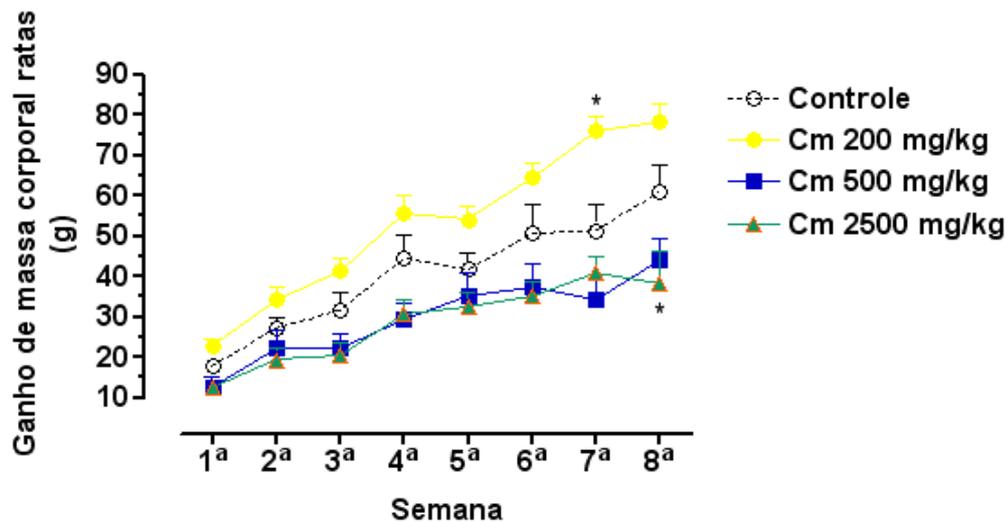


Gráfico 2: Ganho de massa corporal de ratas tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

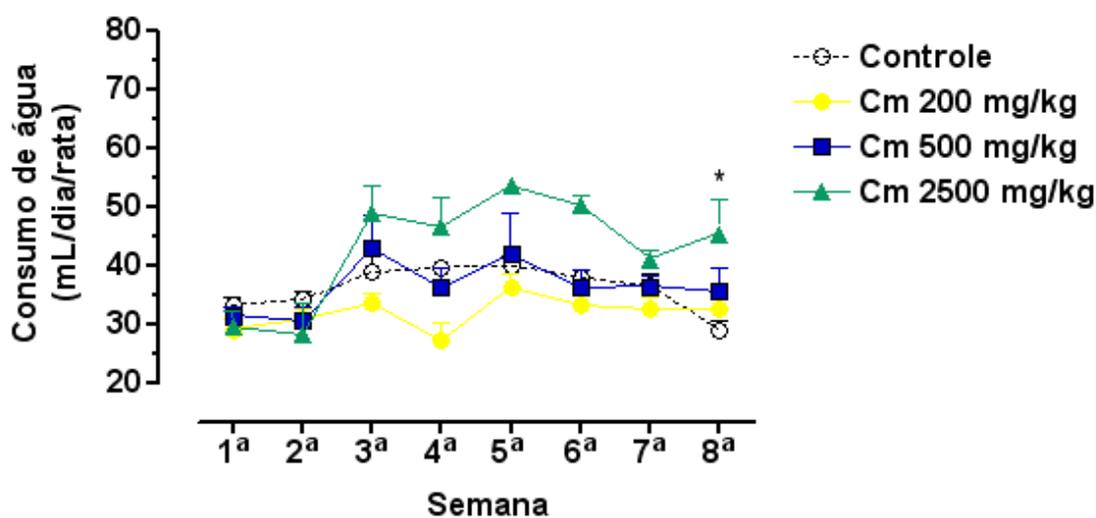


Gráfico 3: Consumo de água de ratas tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

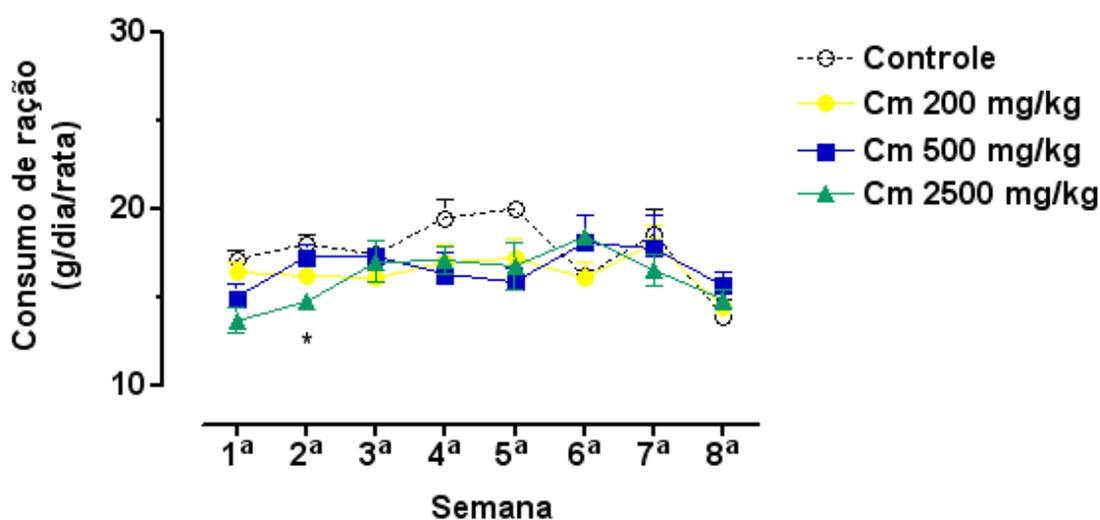


Gráfico 4: Consumo de ração de ratos tratadas por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

Nos ratos houve diminuição estatística do ganho de massa na quinta (47,6%) e sexta (36,3%) semana (gráfico 5). O consumo de água mostrou-se aumentado em relação ao controle na terceira (29,4%), quarta (59,3%), quinta (27,3%), sexta (46,2%), sétima (50,6%) e oitava (44,3%) semana de tratamento com o grupo Cm 2500 mg/kg (gráfico 6), contudo não ocorreu diferença estatística no consumo de ração entre os grupos tratados e grupo controle (Gráfico 7).

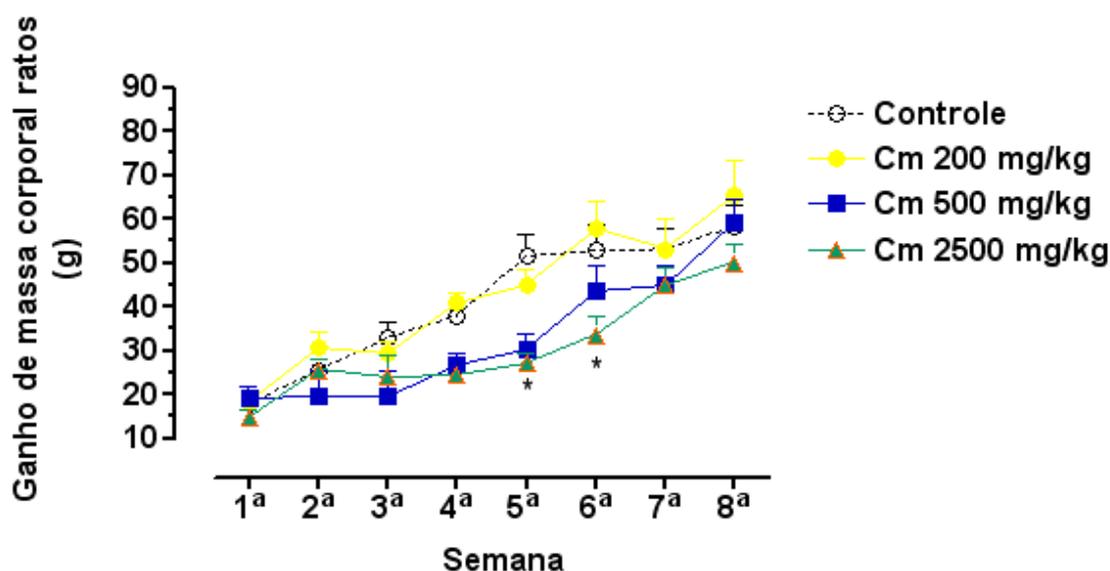


Gráfico 5: Ganho de massa corporal de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

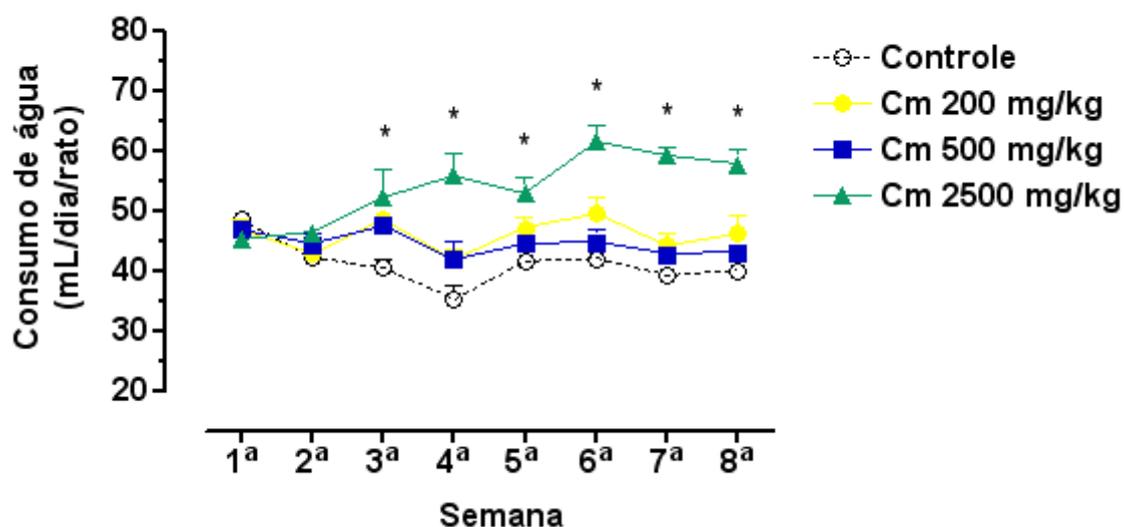


Gráfico 6: Consumo de água de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

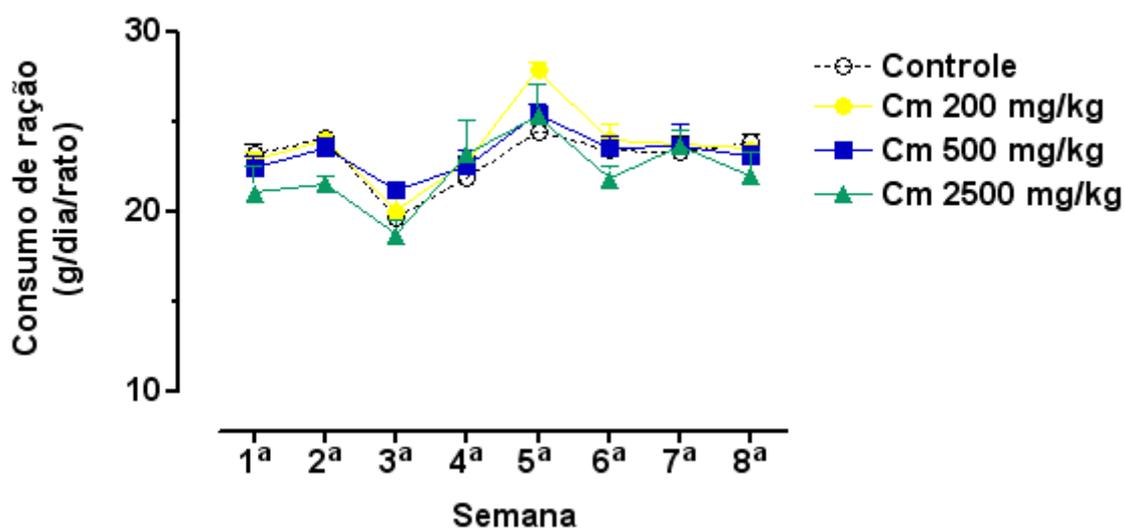


Gráfico 7: Consumo de ração de ratos tratados por oito semanas com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.).

6.7. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm) sobre os parâmetros hematológicos em ratos de ambos os sexos.

Não houve diferença estatística nos parâmetros analisados do hemograma completo entre os animais tratados (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg, v.o.) e o grupo controle (água, v.o.) como mostrado nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Eritrócitos (10⁶/μL)	7,7 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	15,1 ± 0,3	15,2 ± 0,2	14,9 ± 0,2	15,1 ± 0,2
Hematócrito (%)	42,6 ± 0,4	42,3 ± 0,5	41,3 ± 0,5	42,9 ± 0,5
VCM (fL)	55,3 ± 1,1	53,7 ± 0,5	53,8 ± 0,9	54,1 ± 0,4
HCM (pg)	19,6 ± 0,5	19,3 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,1 ± 0,3
CHCM (g/dL)	35,5 ± 0,5	36,0 ± 0,2	35,8 ± 0,3	35,2 ± 0,4
RDW (%)	13,2 ± 0,6	11,5 ± 0,4	12,8 ± 0,5	13,4 ± 0,5
Plaquetas (10³/μL)	784,7 ± 29,3	879,7 ± 48,2	814,3 ± 46,9	853,3 ± 33,5
VPM (fL)	7,0 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,2	7,1 ± 0,4
Leucócitos (10³/μL)	8,0 ± 0,6	8,0 ± 0,5	9,7 ± 0,5	9,6 ± 0,8
Neutrófilos (%)	14,1 ± 1,6	13,0 ± 1,5	15,1 ± 1,5	13,9 ± 2,1
Eosinófilos (%)	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,2 ± 0,4
Basófilos (%)	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0
Linfócitos (%)	82,6 ± 1,8	82,6 ± 1,9	79,7 ± 1,8	81,5 ± 2,7
Monocitos (%)	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,5

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias, VPM: Volume Plaquetário Médio.

Tabela 4. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por oito semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Eritrócitos (10⁶/μL)	7,5 ± 0,3	7,6 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	15,5 ± 0,1	15,4 ± 0,2	15,1 ± 0,2	15,8 ± 0,4
Hematócrito (%)	41,2 ± 1,5	46,2 ± 2,2	42,3 ± 0,4	43,7 ± 1,2
VCM (fL)	55,0 ± 0,3	55,6 ± 0,6	54,6 ± 0,4	56,1 ± 0,5
HCM (pg)	22,6 ± 1,7	20,3 ± 0,2	19,6 ± 0,3	22,8 ± 2,4
CHCM (g/dL)	38,6 ± 2,1	36,4 ± 0,2	35,8 ± 0,5	36,2 ± 0,3
RDW (%)	13,1 ± 0,4	14,3 ± 0,4	13,8 ± 0,4	13,4 ± 0,5
Plaquetas (10³/μL)	808,2 ± 57,8	905,9 ± 43,5	870,4 ± 30,3	882,5 ± 39,5
VPM (fL)	6,8 ± 0,1	7,0 ± 0,4	6,6 ± 0,1	6,6 ± 0,2
Leucócitos (10³/μL)	7,0 ± 0,4	8,3 ± 0,6	7,6 ± 0,6	6,3 ± 0,3
Neutrófilos (%)	15,7 ± 1,3	13,6 ± 1,1	12,8 ± 1,6	15,8 ± 1,8
Eosinófilos (%)	1,0 ± 0,4	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,5
Basófilos (%)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Linfócitos (%)	80,3 ± 1,3	83,3 ± 1,0	83,5 ± 1,7	78,6 ± 1,8
Monócitos (%)	2,5 ± 0,6	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,3	3,7 ± 1,0

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias, VPM: Volume Plaquetário Médio.

Tabela 5. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Eritrócitos (10⁶/μL)	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,3	7,3 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	15,2 ± 0,2	14,9 ± 0,2	14,6 ± 0,3	14,3 ± 0,2
Hematócrito (%)	44,3 ± 1,3	42,7 ± 0,7	42,8 ± 0,6	41,2 ± 0,5
VCM (fL)	53,8 ± 3,2	57,8 ± 0,9	59,9 ± 2,7	56,6 ± 1,1
HCM (pg)	21,3 ± 1,3	20,1 ± 0,3	20,3 ± 0,6	19,7 ± 0,4
CHCM (g/dL)	35,2 ± 0,2	34,8 ± 0,2	34,1 ± 0,7	34,7 ± 0,2
RDW (%)	15,7 ± 0,7	15,5 ± 0,4	16,3 ± 0,7	17,4 ± 1,0
Plaquetas (10³/μL)	806,9 ± 35,2	855,3 ± 55,3	840,1 ± 28,2	816,0 ± 20,9
VPM (fL)	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Leucócitos (10³/μL)	10,7 ± 0,7	9,8 ± 0,8	12,0 ± 0,9	11,6 ± 0,4
Neutrófilos (%)	37,7 ± 3,2	31,8 ± 2,3	30,7 ± 2,7	32,5 ± 3,5
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Basófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Linfócitos (%)	51,4 ± 3,1	57,0 ± 2,6	59,1 ± 2,8	56,7 ± 3,8
Monócitos (%)	9,1 ± 0,4	9,1 ± 0,5	8,2 ± 0,4	8,8 ± 0,6

Valores representados pela média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias, VPM: Volume Plaquetário Médio.

Tabela 6. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por oito semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,2 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	16,3 ± 0,2	16,3 ± 0,2	16,1 ± 0,2	15,3 ± 0,6
Hematócrito (%)	45,4 ± 0,5	44,7 ± 0,6	45,0 ± 1,0	43,8 ± 0,6
VCM (fL)	52,4 ± 0,5	51,6 ± 0,5	51,5 ± 0,7	54,9 ± 0,8
HCM (pg)	18,8 ± 0,2	18,9 ± 0,2	18,8 ± 0,2	19,2 ± 0,7
CHCM (g/dL)	35,9 ± 0,1	36,4 ± 0,1	36,5 ± 0,2	34,8 ± 1,1
RDW (%)	15,4 ± 0,2	14,9 ± 0,2	15,0 ± 0,3	16,3 ± 0,7
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	804,7 ± 17,5	838,3 ± 22,7	878,4 ± 16,9	883,3 ± 22,0
VPM (fL)	6,3 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	13,1 ± 1,0	12,4 ± 0,7	14,2 ± 0,9	10,9 ± 0,1
Neutrófilos (%)	18,0 ± 0,8	14,0 ± 0,4	15,2 ± 1,3	14,6 ± 1,2
Eosinófilos (%)	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,2 ± 0,3
Basófilos (%)	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,29 ± 0,09
Linfócitos (%)	72,1 ± 1,1	83,4 ± 1,0	77,7 ± 1,9	81,9 ± 1,6
Monócitos (%)	4,1 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,8 ± 0,3	3,3 ± 0,3

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias, VPM: Volume Plaquetário Médio.

6.8. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos e coelhos de ambos os sexos.

Na tabela 7 mostra que para o grupo Cm 2500 mg/kg houve aumento da creatinina (200,0%), VLDL (60,4%), triglicerídeos (60,8%), fosfatase alcalina (97,5%), bilirrubina total (111,1%) e direta (160,0%), albumina (6,4%) e amilase (56,7%), bem como aumento de 38,0% também para amilase no grupo Cm 500 mg/kg nas ratas tratadas durante quatro semanas em relação ao grupo controle.

A tabela 8 mostra que ocorreu aumento significativo creatinina (157,0%), VLDL (52,3%) grupo Cm 500 mg/kg, (58,1%) grupo Cm 2500 mg/kg; triglicerídeos (52,3%) para o grupo Cm 500 mg/kg e 58,1% para o grupo Cm 2500 mg/kg e (100,0%) na bilirrubina direta nas ratas tratadas durante oito semanas em relação ao grupo controle.

A tabela 9 mostra aumento de 205,3% na creatinina; 36,3% para a fosfatase alcalina; 400% para a bilirrubina total; 100% para a bilirrubina direta e 4,4% para as proteínas totais no grupo Cm 2500 mg/kg dos ratos tratados durante quatro semanas em relação ao grupo controle.

A tabela 10 mostra aumento significativo de 46,5% na uréia; 175,7% na creatinina; 27,0% para o HDL; 57,5% para a fosfatase alcalina; 185,7% para a bilirrubina total; 800% para a bilirrubina direta; 14,5% para a albumina; 51,3% para amilase e 129,4% para a lactato desidrogenase no grupo Cm 2500 mg/kg, bem como aumento de 120,4% no grupo Cm 500 mg/kg também para a lactato desidrogenase nos ratos tratados durante oito semanas em relação ao grupo controle.

Tabela 7. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas tratadas por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Glicose (mg/dL)	91,3 ± 4,2	91,0 ± 4,0	83,1 ± 3,5	85,4 ± 3,6
Uréia (mg/dL)	40,3 ± 1,9	36,8 ± 2,5	34,1 ± 1,1	39,0 ± 2,5
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,58 ± 0,02	1,23 ± 0,13*
AST (U/L)	109,2 ± 3,4	102,4 ± 3,0	98,0 ± 4,1	93,1 ± 5,6
ALT (U/L)	38,3 ± 1,3	34,4 ± 2,1	36,9 ± 1,5	43,3 ± 2,6
Colesterol total (mg/dL)	119,6 ± 4,4	127,5 ± 7,4	123,6 ± 4,7	132,8 ± 9,0
Colesterol HDL (mg/dL)	81,1 ± 2,4	82,1 ± 3,1	83,8 ± 2,8	88,3 ± 4,0
Colesterol LDL (mg/dL)	33,7 ± 2,8	37,8 ± 3,4	25,4 ± 1,3	29,7 ± 2,4
Colesterol VLDL (mg/dL)	11,1 ± 0,7	9,8 ± 0,6	13,1 ± 0,9	17,8 ± 1,1*
Triglicerídeos (mg/dL)	55,3 ± 3,6	52,4 ± 2,8	67,0 ± 6,3	88,9 ± 5,5*
Fosfatase alcalina (U/L)	71,3 ± 6,3	71,6 ± 5,8	69,8 ± 4,5	140,8 ± 14,8*
Bilirubina total (mg/dL)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,03*
Bilirubina direta (mg/dL)	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,02*
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,05
Proteína total (g/dL)	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Albumina (g/dL)	4,72 ± 0,06	4,63 ± 0,06	4,68 ± 0,09	5,03 ± 0,05*
Amilase (U/L)	1010,0 ± 26,6	1167,0 ± 57,5	1394,0 ± 72,5*	1583,0 ± 71,2*
Lactato desidrogenase (U/L)	312,5 ± 65,9	234,4 ± 66,3	304,0 ± 51,5	410,5 ± 117,8

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0.05).

Tabela 8. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas tratadas por oito semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Glicose (mg/dL)	91,0 ± 1,4	85,7 ± 4,1	81,8 ± 3,9	80,2 ± 3,7
Uréia (mg/dL)	37,6 ± 2,9	36,1 ± 1,0	35,9 ± 1,4	34,7 ± 1,4
Creatinina (mg/dL)	0,47 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,57 ± 0,03	1,18 ± 0,11*
AST (U/L)	114,1 ± 6,5	113,1 ± 2,7	112,1 ± 6,3	115,2 ± 5,4
ALT (U/L)	37,5 ± 2,0	40,0 ± 2,5	35,8 ± 1,2	44,2 ± 3,2
Colesterol total (mg/dL)	112,4 ± 5,2	118,7 ± 5,7	108,8 ± 4,7	109,3 ± 5,8
Colesterol HDL (mg/dL)	60,1 ± 3,8	64,4 ± 5,3	59,6 ± 4,2	73,2 ± 2,7
Colesterol LDL (mg/dL)	27,0 ± 4,4	31,0 ± 1,1	23,8 ± 4,1	14,9 ± 3,3
Colesterol VLDL (mg/dL)	8,6 ± 0,7	9,4 ± 1,0	13,1 ± 0,8*	13,6 ± 1,0*
Triglicerídeos (mg/dL)	43,0 ± 3,6	47,2 ± 4,9	65,5 ± 3,9*	67,8 ± 5,0*
Fosfatase alcalina (U/L)	54,4 ± 4,7	71,2 ± 4,7	53,7 ± 3,3	63,7 ± 5,9
Bilirubina total (mg/dL)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,02*
Bilirubina direta (mg/dL)	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,02*
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,02 ± 0,01	0,0	0,0	0,05 ± 0,02
Proteína total (g/dL)	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,1
Albumina (g/dL)	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1
Amilase (U/L)	1142,0 ± 37,5	1089,0 ± 63,4	1092,0 ± 63,9	1234,0 ± 73,7
Lactato desidrogenase (U/L)	616,3 ± 74,0	384,9 ± 64,1	596,4 ± 83,2	735,0 ± 142,1

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/grupo); AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0.05).

Tabela 9. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Glicose (mg/dL)	91,7 ± 2,5	80,1 ± 2,5	81,0 ± 3,3	80,3 ± 3,8
Uréia (mg/dL)	34,5 ± 1,2	31,5 ± 2,5	39,9 ± 1,0	38,1 ± 3,1
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,01	0,45 ± 0,02*	0,55 ± 0,02*	1,16 ± 0,07*
AST (U/L)	117,7 ± 4,0	112,9 ± 5,4	106,1 ± 5,1	99,5 ± 3,4
ALT (U/L)	48,7 ± 1,9	40,4 ± 2,1	41,7 ± 1,7	43,4 ± 3,5
Colesterol total (mg/dL)	87,0 ± 2,9	97,7 ± 2,9	94,7 ± 4,0	93,9 ± 3,8
Colesterol HDL (mg/dL)	54,9 ± 2,1	59,3 ± 2,8	56,3 ± 3,3	57,7 ± 2,1
Colesterol LDL (mg/dL)	25,3 ± 1,7	27,5 ± 1,9	33,3 ± 2,4	26,3 ± 2,0
Colesterol VLDL (mg/dL)	10,4 ± 0,5	13,0 ± 1,3	12,5 ± 0,8	13,2 ± 1,3
Triglicerídeos (mg/dL)	51,8 ± 2,7	56,3 ± 3,1	62,7 ± 3,9	66,0 ± 6,4
Fosfatase alcalina (U/L)	104,6 ± 4,4	107,3 ± 8,1	111,8 ± 7,5	142,6 ± 12,8*
Bilirubina total (mg/dL)	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,45 ± 0,01*
Bilirubina direta (mg/dL)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,02*
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,0	0,05 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,03
Proteína total (g/dL)	6,66 ± 0,04	6,62 ± 0,08	6,72 ± 0,08	6,95 ± 0,12*
Albumina (g/dL)	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1
Amilase (U/L)	1465,0 ± 57,1	1295,0 ± 68,9	1366,0 ± 52,1	1632,0 ± 63,8
Lactato desidrogenase (U/L)	556,0 ± 44,8	760,0 ± 70,1	628,5 ± 62,8	674,0 ± 66,8

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 10/group). AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, respectivamente, p < 0.05).

Tabela 10. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 200; 500; e 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros bioquímicos em ratos Wistar machos tratados por oito semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Glicose (mg/dL)	95,3 ± 1,7	105,0 ± 6,0	102,4 ± 3,2	101,1 ± 4,8
Uréia (mg/dL)	35,4 ± 1,4	42,8 ± 2,0	45,1 ± 0,7	51,8 ± 4,5*
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,02	1,04 ± 0,07*
AST (U/L)	107,1 ± 2,2	114,7 ± 6,6	109,2 ± 5,2	92,6 ± 2,9
ALT (U/L)	45,6 ± 1,3	51,2 ± 3,6	47,4 ± 2,4	48,6 ± 2,9
Colesterol total (mg/dL)	86,8 ± 4,0	95,4 ± 2,8	99,5 ± 3,5	94,8 ± 4,8
Colesterol HDL (mg/dL)	57,8 ± 3,5	65,9 ± 2,1	67,9 ± 2,8	73,4 ± 2,6*
Colesterol LDL (mg/dL)	20,0 ± 1,6	14,4 ± 4,2	15,3 ± 2,3	12,9 ± 2,9
Colesterol VLDL (mg/dL)	11,5 ± 0,8	12,2 ± 1,1	12,7 ± 1,1	11,13 ± 0,9
Triglicerídeos (mg/dL)	55,9 ± 3,9	60,8 ± 5,6	63,2 ± 5,4	55,5 ± 4,2
Fosfatase alcalina (U/L)	106,0 ± 8,2	102,5 ± 4,8	97,6 ± 6,1	167,0 ± 13,9*
Bilirubina total (mg/dL)	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,03*
Bilirubina direta (mg/dL)	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*	0,18 ± 0,02*
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Proteína total (g/dL)	6,7 ± 0,1	7,0 ± 0,1	6,6 ± 0,3	7,1 ± 0,1
Albumina (g/dL)	4,14 ± 0,06	4,33 ± 0,08	4,27 ± 0,03	4,74 ± 0,05*
Amilase (U/L)	1386,0 ± 61,7	1625,0 ± 110,2	1561,0 ± 62,10	2097,0 ± 83,8*
Lactato desidrogenase (U/L)	402,9 ± 54,0	569,1 ± 42,9	888,0 ± 31,4*	924,3 ± 82,7*

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 10/grupo). AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0.05).

6.9. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre os aspectos macroscópicos e o peso dos principais órgãos em ratos de ambos os sexos.

A tabela 11 mostra que houve aumento significativo na massa absoluta do fígado (40,1%) no grupo Cm 2500 mg/kg e na massa relativa de 16,7%, 14,8% e 45,1%, nas três doses, respectivamente, bem como aumento massa absoluta (34,8%) e massa relativa (37,1%) do estômago das ratas. Já nos ratos, tabela 12, mostra que no grupo Cm 2500 mg/kg houve aumento significativo de 13,0% da massa relativa do fígado e aumento da massa absoluta (50,0%) e relativa (82,0%) da adrenal em comparação ao controle.

Tabela 11. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre a massa dos órgãos de ratas tratadas por oito semanas.

Órgãos	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Coração (g)	0,92 ± 0,03	0,87 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,96 ± 0,06
(g/100g)	0,385 ± 0,011	0,384 ± 0,004	0,420 ± 0,009	0,415 ± 0,015
Rins (g)	0,87 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,92 ± 0,03
(g/100g)	0,364 ± 0,006	0,395 ± 0,012	0,387 ± 0,008	0,398 ± 0,012
Cérebro (g)	1,88 ± 0,03	1,93 ± 0,02	1,92 ± 0,03	1,87 ± 0,06
(g/100g)	0,79 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,82 ± 0,04
Pulmões (g)	1,69 ± 0,07	1,75 ± 0,10	1,64 ± 0,05	1,62 ± 0,07
(g/100g)	0,72 ± 0,04	0,78 ± 0,05	0,74 ± 0,03	0,78 ± 0,06
Fígado (g)	7,71 ± 0,26	8,58 ± 0,30	8,34 ± 0,39	10,80 ± 0,34*
(g/100g)	3,24 ± 0,11	3,78 ± 0,11*	3,72 ± 0,14*	4,70 ± 0,19*
Adrenal (g)	0,038 ± 0,002	0,033 ± 0,003	0,045 ± 0,004	0,038 ± 0,003
(g/100g)	0,028 ± 0,012	0,013 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,001
Baço (g)	0,59 ± 0,038	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,04
(g/100g)	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Estômago (g)	1,64 ± 0,12	1,74 ± 0,04	1,86 ± 0,06	2,21 ± 0,11*
(g/100g)	0,70 ± 0,04	0,77 ± 0,02	0,83 ± 0,03	0,96 ± 0,06*
Intestino delgado (g)	6,23 ± 0,40	7,21 ± 0,62	6,33 ± 0,36	7,39 ± 0,47
(g/100g)	2,64 ± 0,12	3,01 ± 0,23	2,84 ± 0,11	3,06 ± 0,21
Ovários (g)	0,072 ± 0,004	0,064 ± 0,003	0,065 ± 0,003	0,073 ± 0,006
(g/100g)	0,030 ± 0,001	0,028 ± 0,001	0,029 ± 0,002	0,026 ± 0,004
Útero (g)	0,53 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,48 ± 0,08
(g/100g)	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,02

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 10/grupo). Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0.05).

Tabela 12. Efeito do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) administrado por via oral sobre a massa dos órgãos de ratos tratados por oito semanas.

Órgãos	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Coração (g)	1,34 ± 0,05	1,36 ± 0,05	1,42 ± 0,05	1,31 ± 0,08
(g/100g)	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,01
Rins (g)	1,47 ± 0,05	1,39 ± 0,03	1,49 ± 0,03	1,44 ± 0,02
(g/100g)	0,390 ± 0,006	0,358 ± 0,009	0,387 ± 0,006	0,390 ± 0,015
Cérebro (g)	2,06 ± 0,10	1,96 ± 0,05	2,16 ± 0,09	1,77 ± 0,14
(g/100g)	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,48 ± 0,04
Pulmões (g)	2,41 ± 0,16	2,22 ± 0,12	2,68 ± 0,21	2,40 ± 0,13
(g/100g)	0,65 ± 0,05	0,59 ± 0,03	0,70 ± 0,06	0,35 ± 0,01
Fígado (g)	12,16 ± 0,58	13,23 ± 0,32	13,64 ± 0,51	13,54 ± 0,53
(g/100g)	3,23 ± 0,11	3,53 ± 0,08	3,53 ± 0,06	3,65 ± 0,12*
Adrenal (g)	0,034 ± 0,003	0,043 ± 0,004	0,041 ± 0,002	0,051 ± 0,004*
(g/100g)	0,0089 ± 0,0008	0,0118 ± 0,0009	0,0107 ± 0,0008	0,0162 ± 0,0024*
Baço (g)	0,79 ± 0,02	0,77 ± 0,04	0,79 ± 0,03	0,89 ± 0,05
(g/100g)	0,216 ± 0,007	0,205 ± 0,009	0,204 ± 0,007	0,240 ± 0,015
Estômago (10g)	2,27 ± 0,09	2,09 ± 0,06	2,14 ± 0,13	2,39 ± 0,13
(g/100g)	0,61 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,65 ± 0,05
Intestino delgado (g)	8,34 ± 0,41	6,82 ± 0,47	7,21 ± 0,45	8,00 ± 0,39
(g/100g)	2,23 ± 0,11	1,85 ± 0,10	1,87 ± 0,11	2,17 ± 0,15
Testículos (g)	1,69 ± 0,05	1,60 ± 0,06	1,61 ± 0,04	1,67 ± 0,06
(g/100g)	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,45 ± 0,01
Epidídimo (g)	0,72 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,63 ± 0,03
(g/100g)	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Canal deferente (g)	0,244 ± 0,011	0,232 ± 0,014	0,249 ± 0,028	0,193 ± 0,005
(g/100g)	0,066 ± 0,004	0,062 ± 0,004	0,066 ± 0,007	0,052 ± 0,003
Vesícula seminal (g)	1,35 ± 0,06	1,64 ± 0,15	1,39 ± 0,07	1,32 ± 0,14
(g/100g)	0,36 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,04

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 10/grupo). Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0.05)

6.10. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre a morfologia dos órgãos de ratos de ambos os sexos.

A análise microscópica não revelou quaisquer anormalidades nos tecidos após tratamento com *C. multijuga* em doses de 200, 500 e 2500 mg/kg. Os tecidos apresentaram estruturas normais, com as células bem preservadas e bem delineadas nos grupos controle e tratados. O interstício também apresentou-se intacto, sem infiltrados de células inflamatórias não sendo encontradas alterações significativas nos principais órgãos analisados (fígado, rins, pulmão, coração, baço, cérebro, ovário, útero e testículos), evidenciando assim estruturas tissulares preservadas (Figuras 11 a 19).

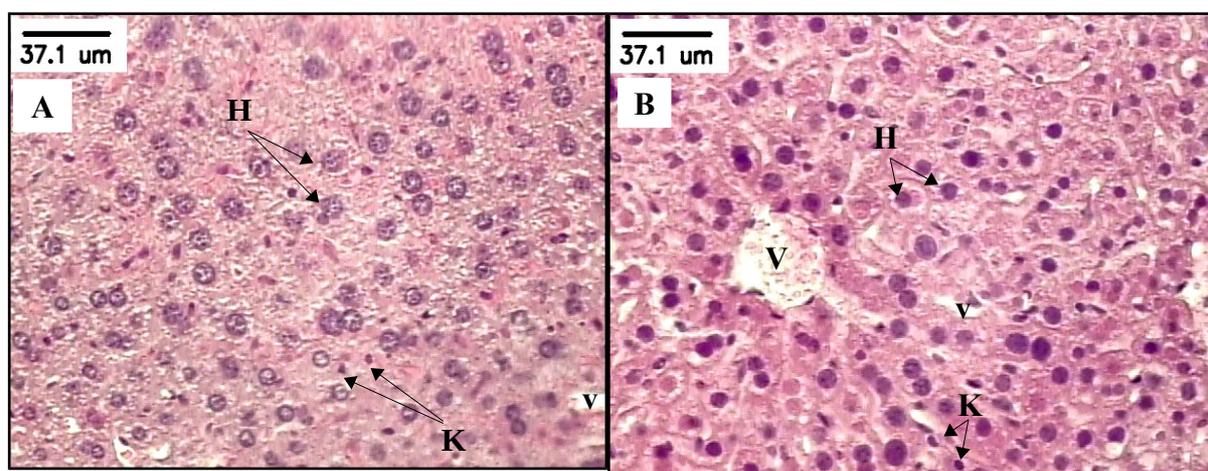


Figura 11: Fotomicrografia do fígado de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Núcleos de Hepatócitos (H), células de Kuppfer (K), vasos capilares (v) e a veia centro lobular (V).

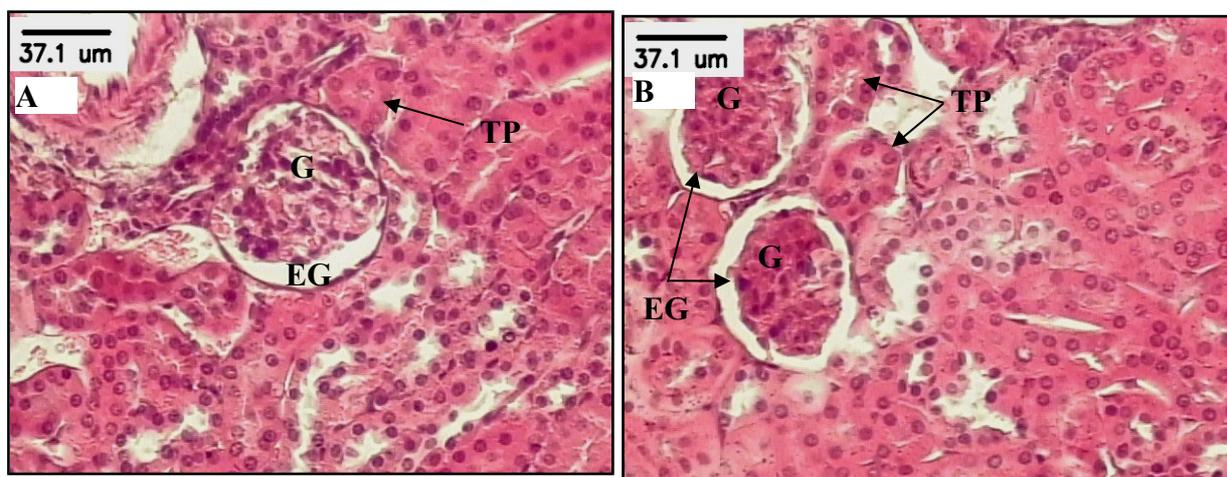


Figura 12: Fotomicrografia do rim de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Glomérulo de malpighi (G), tubos contorcidos proximais (TP) e espaço glomerular (EG).

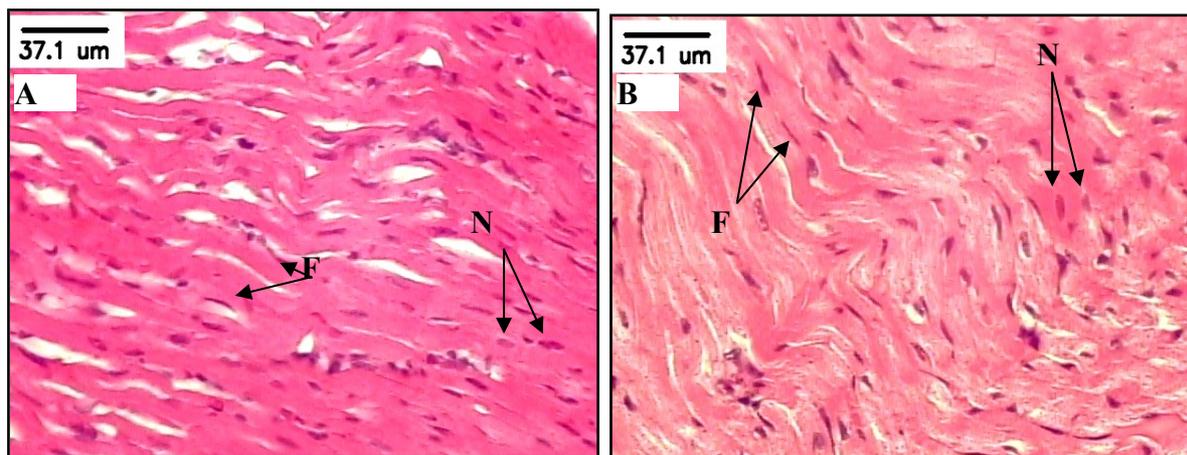


Figura 13: Fotomicrografia do coração de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Núcleos de células musculares cardíacas (N) e fibroblastos (F).

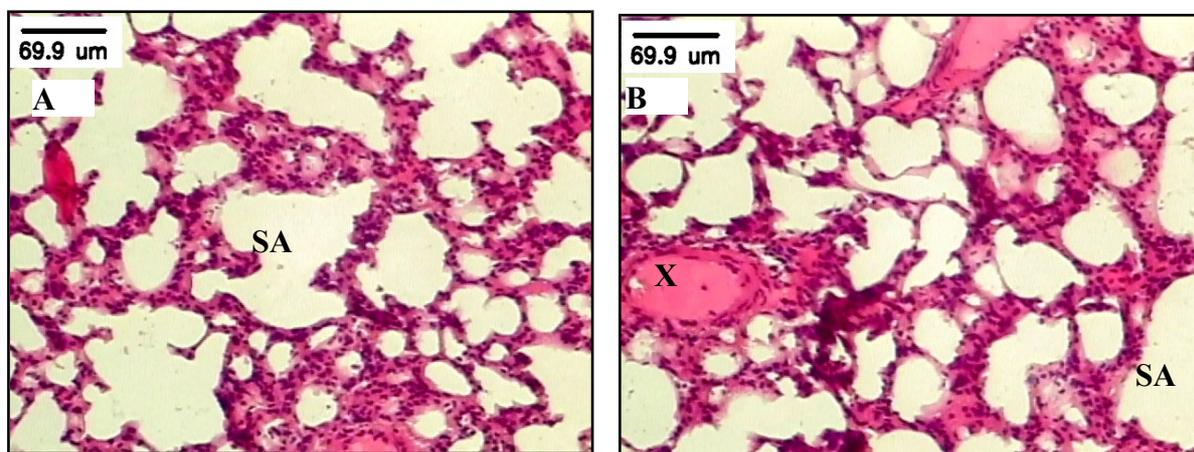


Figura 14: Fotomicrografia do pulmão de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 200 mg/kg, C) Cm 500 mg/kg e D) Cm 2500 mg/kg. Bronquíolos (X); Sáculo alveolar (SA).

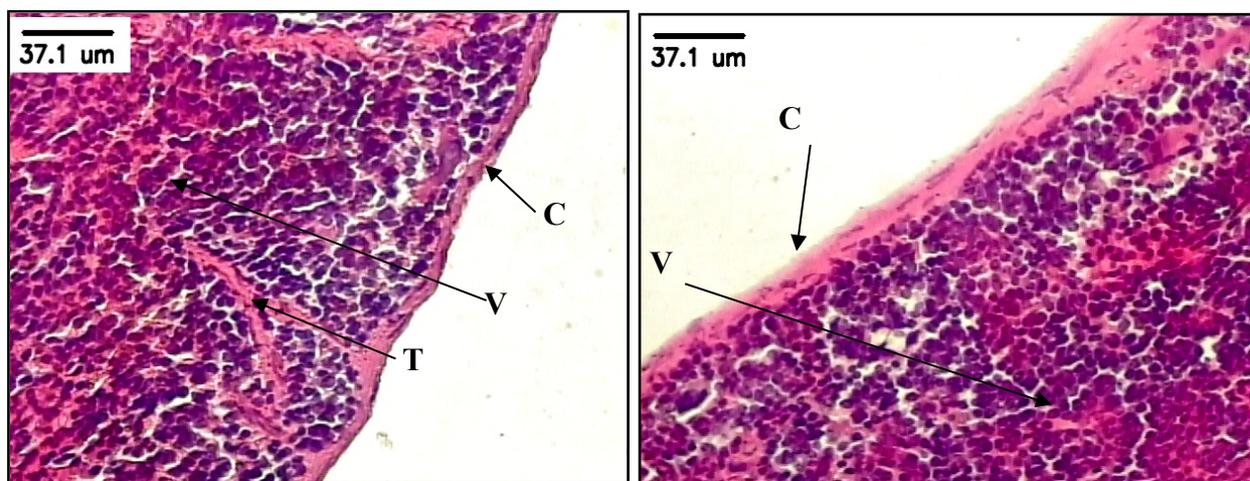


Figura 15: Fotomicrografia do baço de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Cápsula (C), trabéculas (T), polpa vermelha (V).

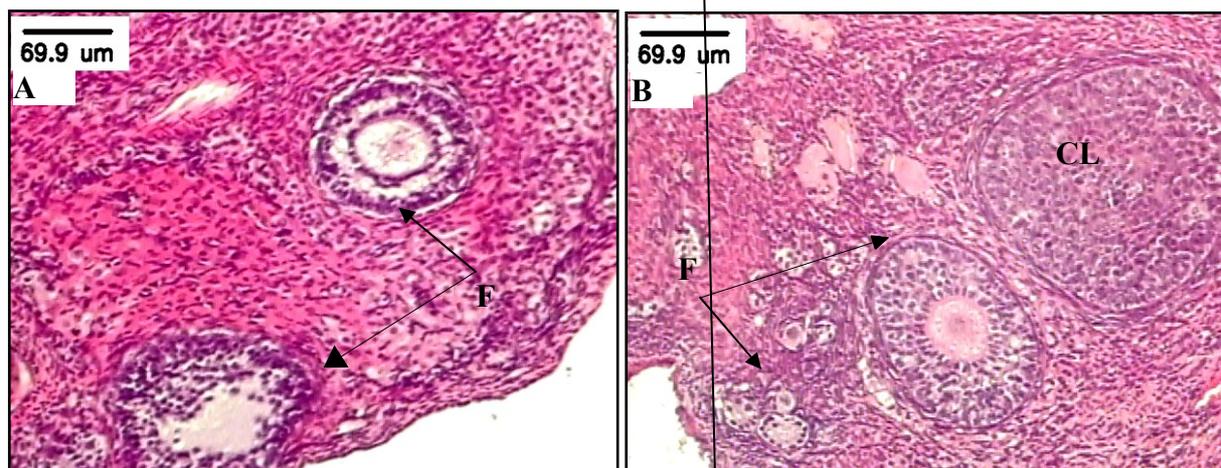


Figura 16: Fotomicrografia do ovário de rata tratada durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento (F) e corpo lúteo (CL).

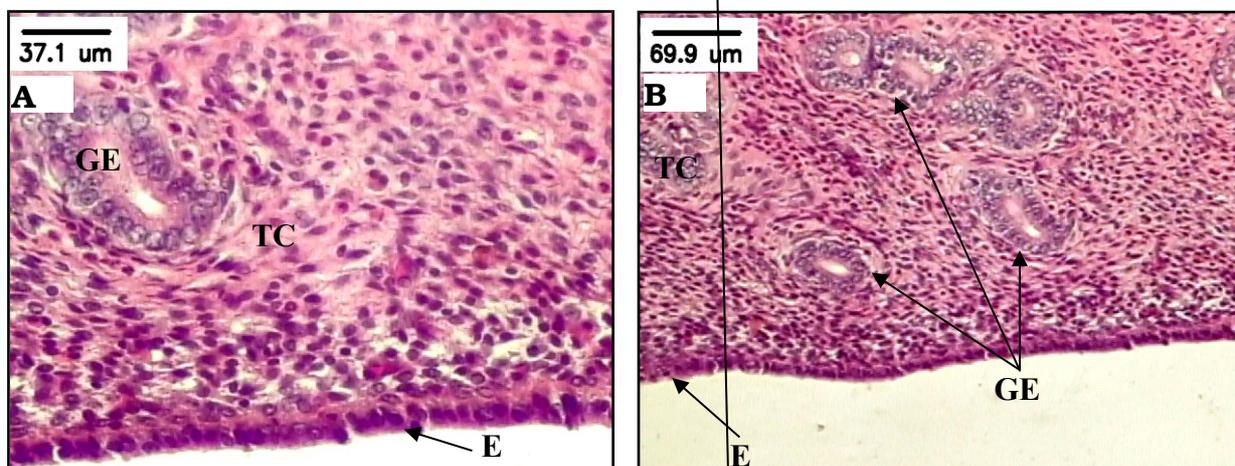


Figura 17: Fotomicrografia do útero de rata tratada durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg (aumento de 100x). Epitélio endometrial (E), tecido conjuntivo frouxo (TC), glândulas endometriais (GE).

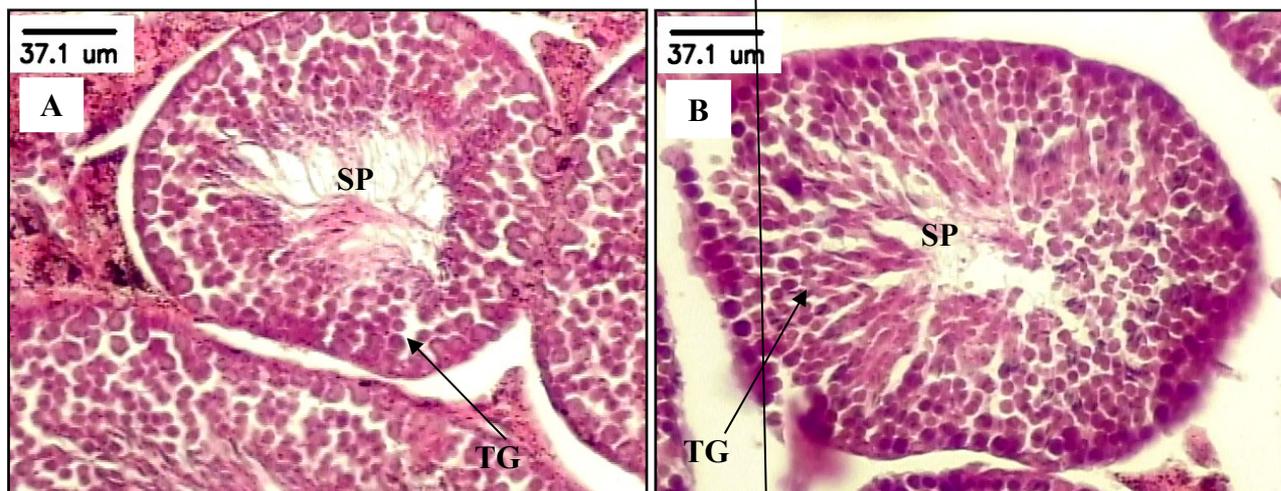


Figura 18: Fotomicrografia túbulo seminífero em corte transversal do testículo de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina. A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Tecido germinativo (TG) e espermatozoides (SP).

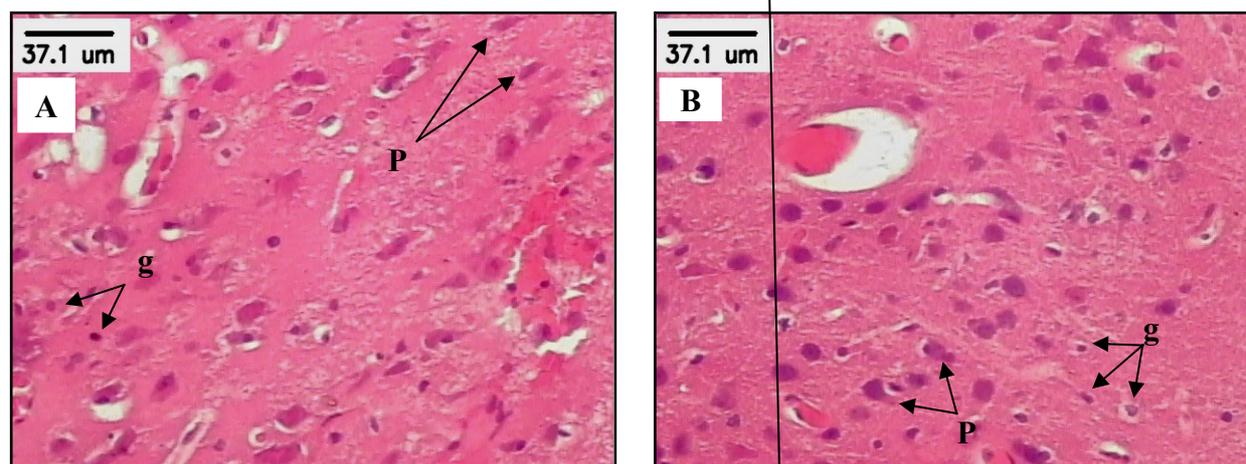


Figura 19: Fotomicrografia do cérebro de rato tratado durante oito semanas, coloração hematoxilina eosina (aumento de 200x). A) Grupo controle água, B) Cm 2500 mg/kg. Neurônios piramidais (P) e células gliais (g).

6.11. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre ratas prenhes.

O óleo de *C. multijuga* administrado por via oral nas doses de 200, 500 e 2500 mg/kg, durante o período da prenhez (1º ao 20º dia) não resultou em mortes entre as ratas. Durante todo período de tratamento, também não foram observados sinais externos de toxicidade, como piloereção, diarreia e alteração da atividade locomotora.

6.11.1. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o ganho de massa corporal, consumo de água e ração das ratas durante a prenhez.

No 20º dia de gestação ocorreu diminuição do ganho de massa de 18,5%; 20,9% e 29,0% respectivamente para os grupos Cm 200, 500 e 2500 mg/kg em relação ao controle (gráfico 8). O consumo de água do grupo Cm 2500 mg/kg foi estatisticamente maior tanto no 14º (18,2%) quanto no 20º (32,3%) dia de prenhez em relação ao grupo controle (gráfico 9). Não houve diferença no consumo de ração entre os grupos tratado e o controle ao longo do período de prenhez (gráfico 10).

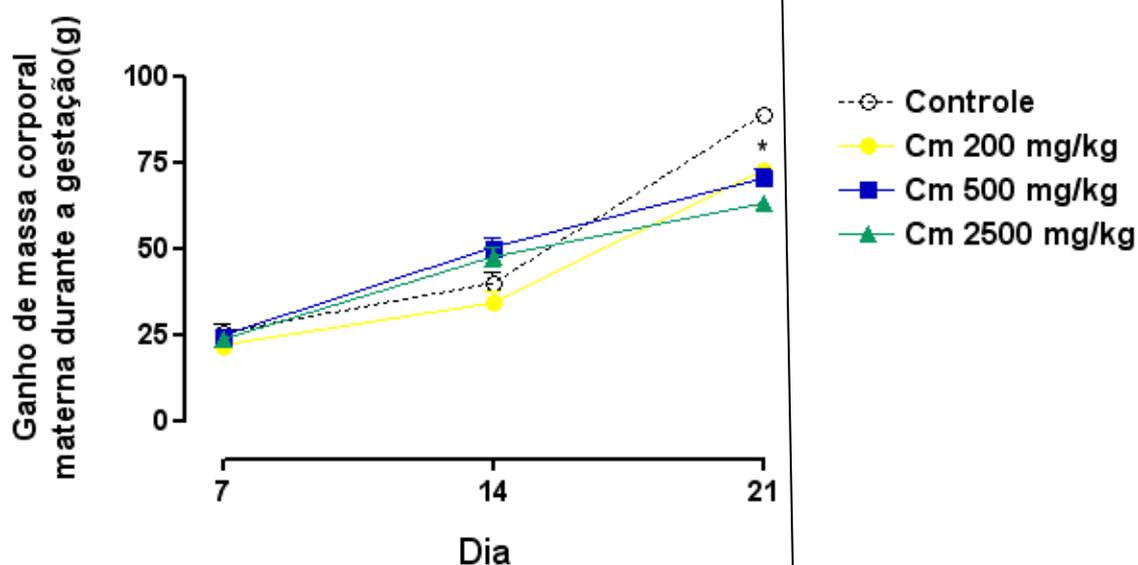


Gráfico 8. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o ganho de massa corporal materna durante a prenhez em relação ao grupo controle. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

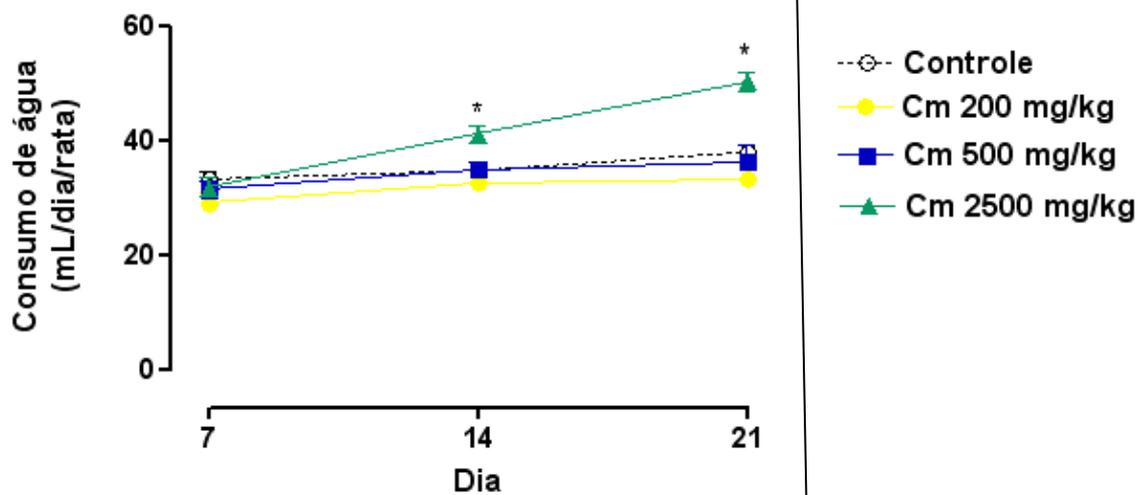


Gráfico 9. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o consumo de água durante a prenhez em relação ao grupo controle. * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0.05$).

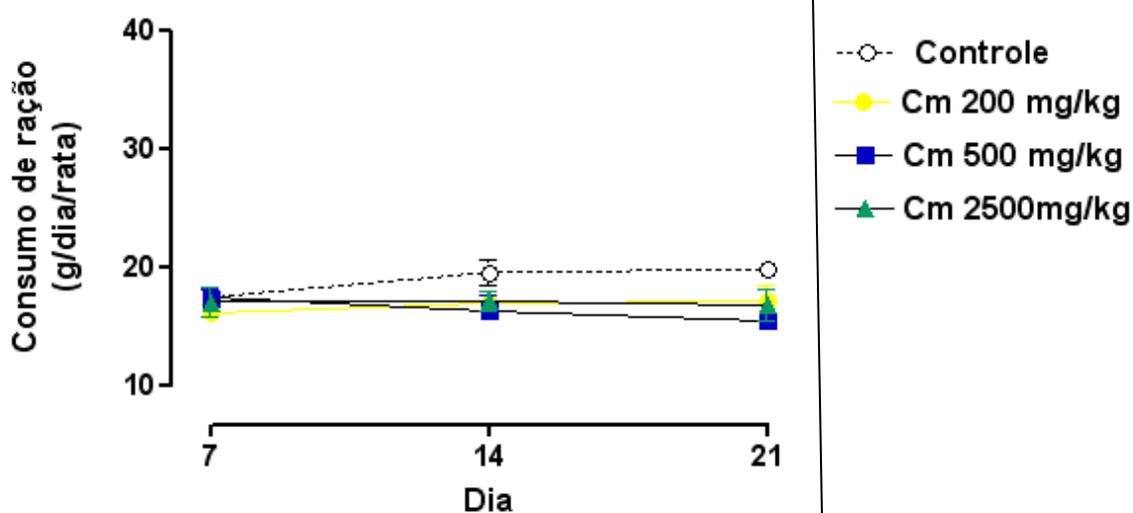


Gráfico 10. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre o consumo de ração durante a prenhez em relação ao grupo controle.

6.11.2. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, após o tratamento durante a prenhez (1^o ao 20^o dia).

Após laparotomia (20^o dia) realizada antes do parto a termo, não se visualizou entre os grupos tratados e o controle a presença de natimortos, assim como, ao exame macroscópico externo nenhuma malformação foi detectada bem como o tratamento com óleo não alterou de forma significativa as variáveis reprodutivas analisadas em relação ao grupo controle, com exceção da massa das mães (Δ final–inicial, g) que ocorreu diminuição de 19,7%; 20,9 % e 30,1% para os respectivos grupos (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg), a massa absoluta dos fetos apresentou-se menor 8,7%; 9,8% e 8,1% também para as três doses e o comprimento dos fetos que foi menor 2,2% no grupo Cm 2500 mg/kg em relação ao controle (tabela 13).

Tabela 13. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento durante a prenhez (1° ao 20° dia).

Variáveis reprodutivas	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Ratas prenhes	12	10	10	10
Massa das mães (Δ final – inicial, g)	88,8 \pm 2,8	71,3 \pm 3,7*	70,2 \pm 4,8*	62,1 \pm 2,4*
Número de fetos vivos	136	94	96	104
Número de fetos mortos	0	0	0	0
Relação feto/mãe	11,3 \pm 0,9	9,4 \pm 0,8	9,6 \pm 0,9	10,4 \pm 0,7
Massa absoluta dos fetos (g)	3,56 \pm 0,03	3,25 \pm 0,05*	3,21 \pm 0,05*	3,27 \pm 0,06*
Massa relativa dos fetos (g/100g)	1,01 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02	1,09 \pm 0,03
Comprimento dos fetos (cm)	2,78 \pm 0,01	2,75 \pm 0,02	2,73 \pm 0,01	2,72 \pm 0,05*
Massa absoluta das placentas (g)	0,48 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	0,52 \pm 0,01
Massa relativa das placentas (g/100g)	0,140 \pm 0,002	0,163 \pm 0,004	0,154 \pm 0,003	0,171 \pm 0,004
Massa absoluta dos ovários (mg)	75,1 \pm 3,7	74,7 \pm 1,0	75,5 \pm 1,0	75,2 \pm 0,7
Massa relativa dos ovários (mg/100g)	21,7 \pm 0,8	22,8 \pm 0,8	24,0 \pm 0,4	23,3 \pm 0,4
Número de implantação	147	106	107	113
Número de implantações viáveis	136	94	96	104
Número de reabsorção	11	12	11	9
Número de corpos lúteos	14,0 \pm 1,2	12,8 \pm 0,8	13,8 \pm 1,2	14,0 \pm 0,3
Índice de reabsorção (%)	7,5	11,3	10,3	8,0
Índice de implantação (%)	88,1	83,3	76,5	83,3
Perda pré-implantação (%)	11,9	16,7	23,6	16,7
Perda pós-implantação (%)	7,7	0,0	8,7	12,5

Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média (massa das mães, massa absoluta e relativa e comprimento dos fetos, massa absoluta e relativa de placentas e ovários e número de corpos lúteos). O grupo controle recebeu água. Índice de reabsorção (número de reabsorções x 100/ número de implantes), índice de implantação (número total de sítios de implantações/número total de corpos lúteos x 100), perda pré-implantação (número de corpos lúteos – número de implantações/número de corpos lúteos x 100) e perda pós-implantação (número de implantações – número de fetos vivos/número de implantações x 100). * Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA) seguido pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls p < 0.05).

6.12. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre as variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Os parâmetros reprodutivos durante as oito semanas de tratamento com *C. multijuga* (200 , 500 ou 2500 mg / kg) por via oral , não houve mortes e o tratamento não produziu alteração no ganho de massa corporal, perturbações do comportamento ou sinais de toxicidade nos ratos. A Tabela 15 mostra os parâmetros obtidos a partir da reprodução de acasalamento de fêmeas não tratadas e machos tratados com *C. multijuga*. Não houve diferença significativa no ganho de massa e tempo de prenhez indicadores dos grupos tratados em comparação com o grupo de controle. Após o nascimento da prole, não encontramos a presença de natimortos, ou qualquer malformação fetal, através de exame macroscópico externo dos filhotes dos grupos tratados e o grupo controle, indicando que não há efeitos teratogênicos visíveis externamente. Além disso, não foi observada diferença significativa na relação prole/mãe e na porcentagem de fetos mortos. Os índices de prenhez, viabilidade e lactação dos ratos tratados com *C. multijuga* foram os mesmos que os obtidos no grupo de controle. Além disso , a exposição de ratos do sexo masculino para o óleo de copaíba não afeta o desenvolvimento pós-natal de sua descendência (Tabela 14) .

Tabela 14: Efeito do tratamento por via oral com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500mg/kg) por oito semanas consecutivas sobre as variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Parâmetros	Controle	Cm		
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Ratas prenhes	10	10	10	10
Ganho de massa no período de prenhez (g)	54,1 ± 5,9	53,6 ± 7,7	53,2 ± 5,6	59,8 ± 7,3
Dias de prenhez (dias)	21,1 ± 0,2	21,2 ± 0,2	21,0 ± 0,2	21,0 ± 0,2
Número de fetos vivos	94	98	91	93
Número de fetos mortos	0	0	0	0
Relação prole/mãe	9,4 ± 0,6	9,8 ± 0,6	9,1 ± 0,9	9,3 ± 0,8
Índice de prenhez (%)	100	100	100	100
Índice de viabilidade (%)	100	100	100	100
Índice de lactação (%)	100	100	100	100
Massa corporal da prole 1º dia (g)	6,3 ± 0,1	5,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Massa corporal da prole 4º dia (g)	7,98 ± 0,04	8,11 ± 0,03	8,11 ± 0,04	8,17 ± 0,05
Massa corporal da prole 7º dia (g)	12,6 ± 0,4	13,0 ± 0,5	12,6 ± 0,3	14,1 ± 0,5
Massa corporal da prole 14º dia (g)	25,4 ± 0,6	23,9 ± 1,0	25,0 ± 2,5	27,3 ± 0,9
Massa corporal da prole 21º dia (g)	39,0 ± 1,1	38,9 ± 1,0	37,0 ± 0,8	40,8 ± 1,4
Comprimento da prole 1º dia (cm)	4,8 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1
Comprimento da prole 4º dia (cm)	5,66 ± 0,03	5,76 ± 0,02	5,71 ± 0,02	5,53 ± 0,02
Comprimento da prole 7º dia (cm)	6,56 ± 0,04	6,59 ± 0,04	6,47 ± 0,04	6,65 ± 0,05
Comprimento da prole 14º dia (cm)	8,7 ± 0,1	8,9 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,9 ± 0,1
Comprimento da prole 21º dia (cm)	9,9 ± 0,1	9,8 ± 0,1	9,9 ± 0,1	10,0 ± 0,2

Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (n=10/grupo). O grupo controle recebeu água. Índice de fertilidade = número de ratas prenhes/número de acasaladas x 100. Índice de viabilidade = número de filhotes vivos após nascimento/número de fetos vivos no nascimento x 100. Índice de lactação = número de filhotes vivos no 21º dia após nascimento/número de filhotes vivos no 4º dia após nascimento x 100.

6.12.1. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500 mg/kg) sobre os parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do grupo tratado por oito semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Não houve diferença significativa no número médio de filhotes vivos ao nascer entre o grupo controle e *C. multijuga* 200, 500 e 2500 mg/kg. Além disso, não foi observada diferença significativa nos parâmetros comportamentais (reflexo postural, dia da abertura dos olhos, dia do andar adulto e ambulação espontânea) entre os grupos (Tabela 15).

Tabela 15: Parâmetros comportamentais da prole do acasalamento entre ratos do grupo tratado com óleo de *C. multijuga* (Cm 200, 500 e 2500mg/kg) por 8 semanas consecutivas (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

Parâmetros	Controle	Cm	Cm	Cm
		200 mg/kg	500 mg/kg	2500 mg/kg
Número da prole	24	25	23	22
Reflexo postural 1º dia (s)	16,45 ± 1,61	12,42 ± 1,59	12,20 ± 1,43	16,21 ± 1,85
Reflexo postural 7º dia (s)	2,03 ± 0,97	1,65 ± 0,34	1,45 ± 0,29	1,30 ± 0,21
Dia de abertura de olhos	14,19 ± 0,04	14,11 ± 0,04	14,39 ± 0,08	14,10 ± 0,04
Dia do andar adulto	14,40 ± 0,05	14,26 ± 0,06	14,30 ± 0,08	14,24 ± 0,07
Ambulação espontânea (número de quadros invadidos)	14,81 ± 0,11	14,67 ± 0,11	14,56 ± 0,12	14,37 ± 0,09

Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (n=22-25/grupo).

6.13. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros de avaliação renal.

6.13.1. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos em coelhos.

A tabela 16 mostra aumento significativo da creatinina (40,0%), do colesterol total (115,0%) e do LDL (462,2%) e da bilirrubina total (400,0%) nas coelhas tratadas com a dose 2500 mg/kg do óleo de copaíba durante quatro semanas. Houve também aumento significativo da creatinina (42,3%), colesterol total (102,2%), LDL (417,9%), bilirrubina total (833,3%) e bilirrubina direta (333,3%) nos coelhos tratados com a dose 2500 mg/kg durante quatro semanas em relação ao grupo controle.

Tabela 16. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros bioquímicos em coelhas e coelhos Nova Zelândia adultos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm	Controle	Cm
	♀	♀	♂	♂
		2500 mg/kg		2500 mg/kg
Glicose (mg/dL)	106,2 ± 1,6	108,2 ± 8,9	105,8 ± 1,7	114,6 ± 3,6
Uréia (mg/dL)	29,9 ± 0,8	39,0 ± 1,7	29,9 ± 1,5	35,2 ± 1,9
Creatinina (mg/dL)	1,02 ± 0,02	1,54 ± 0,14*	1,04 ± 0,05	1,48 ± 0,02*
AST (U/L)	50,0 ± 3,9	56,7 ± 4,9	39,2 ± 1,6	53,6 ± 6,3
ALT (U/L)	107,1 ± 4,6	112,5 ± 7,9	102,6 ± 10,6	93,8 ± 6,0
Colesterol total (mg/dL)	63,7 ± 2,1	137,0 ± 3,7*	55,8 ± 7,4	112,8 ± 9,0*
Colesterol HDL (mg/dL)	42,0 ± 1,8	50,3 ± 4,2	34,8 ± 5,0	42,8 ± 3,4
Colesterol LDL (mg/dL)	11,9 ± 0,7	66,9 ± 7,3*	11,2 ± 3,0	58,0 ± 7,5*
Colesterol VLDL (mg/dL)	12,9 ± 1,9	16,2 ± 2,2	9,9 ± 0,6	12,3 ± 2,8
Triglicerídeos (mg/dL)	71,0 ± 9,5	81,0 ± 11,0	49,8 ± 3,3	60,8 ± 14,3
Fosfatase alcalina (U/L)	175,8 ± 13,9	130,3 ± 17,2	170,8 ± 2,7	177,0 ± 16,6
Bilirubina total (mg/dL)	0,04 ± 0,02	0,16 ± 0,09*	0,06 ± 0,02	0,45 ± 0,24*
Bilirubina direta (mg/dL)	0,04 ± 0,02	0,16 ± 0,09*	0,06 ± 0,02	0,23 ± 0,13*
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,0	0,0	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02
Proteína total (g/dL)	6,4 ± 0,1	6,4 ± 0,2	6,3 ± 0,1	6,4 ± 0,2
Albumina (g/dL)	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,40 ± 0,03	5,52 ± 0,11
Amilase (U/L)	244,8 ± 2,2	247,0 ± 4,7	254,8 ± 11,8	263,4 ± 12,9
Lactato desidrogenase (U/L)	161,4 ± 6,4	156,7 ± 45,2	303,4 ± 48,4	292,0 ± 17,0

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 5/grupo). AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (teste t não pareado, p < 0,05).

6.13.2. Efeito da administração oral do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) sobre os parâmetros de avaliação renal em ratos.

Os parâmetros, peptídeo natriurético (BNP) e a creatina quinase – MB (massa) (CKMB) não foram detectados nos respectivos métodos utilizados, quimioluminescência e eletroquimioluminescência, pois se apresentaram abaixo do limite inferior de sensibilidade de leitura do aparelho Centauro XP – 7 Siemens[®], que é de 2,0 pg/mL para o BNP, e, 0,3 ng/mL para a CKMB.

A figura 20 mostra a diferença da tonalidade de cor do plasma entre os grupos tratados via oral com água (controle) e o óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por quatro semanas, onde a tonalidade do grupo tratado é mais escura em relação ao controle.

A tabela 17 mostra diminuição estatística de 95,2% da creatinina urinária nos ratos (Cm 2500 mg/kg) em relação ao controle.

Na tabela 18 a aldosterona teve aumento estatístico de 119,0%, relação A/G de 11,17% nos ratos e de creatinina de 207,0% e 277,2% respectivamente para as ratas e os ratos do grupo Cm 2500 mg/kg em relação ao grupo controle.

Na avaliação global da função renal (Tabela 19) observa-se diminuição de 8,5% da média da massa corporal no 30º dia das ratas e diminuição de 98,9% da diferença da massa corporal (Δ final - inicial, g) para os ratos. A área de superfície corporal diminuiu 5,4% para as fêmeas e a diferença da área de superfície corporal (Δ final - inicial, cm²) 99,3% para os machos; houve aumento estatístico de 50,0% e 109,1% no volume de urina coletado em 24 horas respectivamente pelas ratas e ratos, bem como do consumo de água em 24 horas de 30,8% para as ratas e 31,3% para os ratos; a estimativa do ritmo de filtração glomerular (eRFG) foi menor 67,8% para as ratas e 69,5% para os ratos; o fluxo urinário em 24 horas foi maior em 50,5% para as ratas e 92,1% para os ratos; o clearance de creatinina corrigido apresentou aumento estatístico de 46,8% (mL/g/min) e 45,5% (mL/cm²/min) para os machos; a fração de excreção de sódio apresenta-se diminuída em 60,6% nas ratas e 78,3% nos ratos e também a fração de excreção de potássio 62,3% nas ratas e 82,2% em ratos do grupo Cm 2500 mg/kg em relação ao grupo controle.

Tabela 17. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros bioquímicos da urina em ratos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm	Controle	Cm
	♀	♀	♂	♂
		2500 mg/kg		2500 mg/kg
Proteínas totais (mg/dL)	10,3 ± 1,1	9,6 ± 0,7	21,8 ± 1,9	28,6 ± 5,0
Albumina (mg/dL)	0,71 ± 0,26	0,25 ± 0,17	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,5
Creatinina (mg/dL)	46,0 ± 8,5	38,2 ± 3,2	130,9 ± 8,6	63,6 ± 5,6*
Relação A/C (10⁻²)	2,0 ± 0,8	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,8
Creatinina 24 h (mg/24h)	5,2 ± 0,6	6,4 ± 1,3	14,0 ± 1,0	13,1 ± 2,0
Sódio (mmol/24h)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,2 ± 0,1
Potássio (mmol/24h)	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,9 ± 0,5	1,7 ± 0,3
Cloreto (mmol/24h)	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,4	3,4 ± 0,7	1,8 ± 0,3

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 5/grupo). * Estatisticamente diferente do grupo controle (teste t não pareado, p < 0.05).

Tabela 18. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros bioquímicos séricos de avaliação renal em ratos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm	Controle	Cm
	♀	♀	♂	♂
		2500 mg/kg		2500 mg/kg
Aldosterona (ng/dL)	32,5 ± 6,9	37,2 ± 7,3	70,5 ± 10,6	154,4 ± 20,4*
Proteínas totais (g/dL)	8,0 ± 0,2	8,9 ± 0,4	7,8 ± 0,2	8,1 ± 0,4
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,5 ± 0,2
Globulinas (g/dL)	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,6 ± 0,3
Relação A/G	1,18 ± 0,07	1,07 ± 0,03	1,11 ± 0,03	1,24 ± 0,04*
Vasopressina (pg/mL)	4,5 ± 0,3	2,8 ± 0,9	4,5 ± 0,3	4,4 ± 0,1
Osmolaridade (mOsm/kg)	375,7 ± 21,7	270,5 ± 85,7	284,0 ± 21,9	262,8 ± 24,8
Amilase total (U/L)	1385,0 ± 180,0	1497,0 ± 337,9	1996,0 ± 323,5	1689,0 ± 193,5
Cloro (mEq/L)	107,8 ± 1,7	111,8 ± 3,9	118,8 ± 3,5	115,2 ± 7,1
Potássio (mEq/L)	5,3 ± 0,2	6,1 ± 0,3	6,1 ± 0,6	6,2 ± 0,8
Magnésio (mg/dL)	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,5
Sódio (mEq/L)	143,8 ± 0,8	146,0 ± 1,7	147,0 ± 1,1	146,3 ± 0,7
LDH (U/L)	1291,0 ± 163,7	1412,0 ± 168,1	824,8 ± 134,4	867,7 ± 121,3
Creatinina (mg/dL)	0,57 ± 0,02	1,75 ± 0,36*	0,57 ± 0,03	2,15 ± 0,48*
Uréia (mg/dL)	38,8 ± 1,3	51,8 ± 7,7	49,0 ± 6,0	51,8 ± 8,2
Cistatina C (mg/L)	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,10	0,28 ± 0,07

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 5/grupo). LDH – lactato desidrogenase. * Estatisticamente diferente do grupo controle (teste t não pareado, p < 0.05).

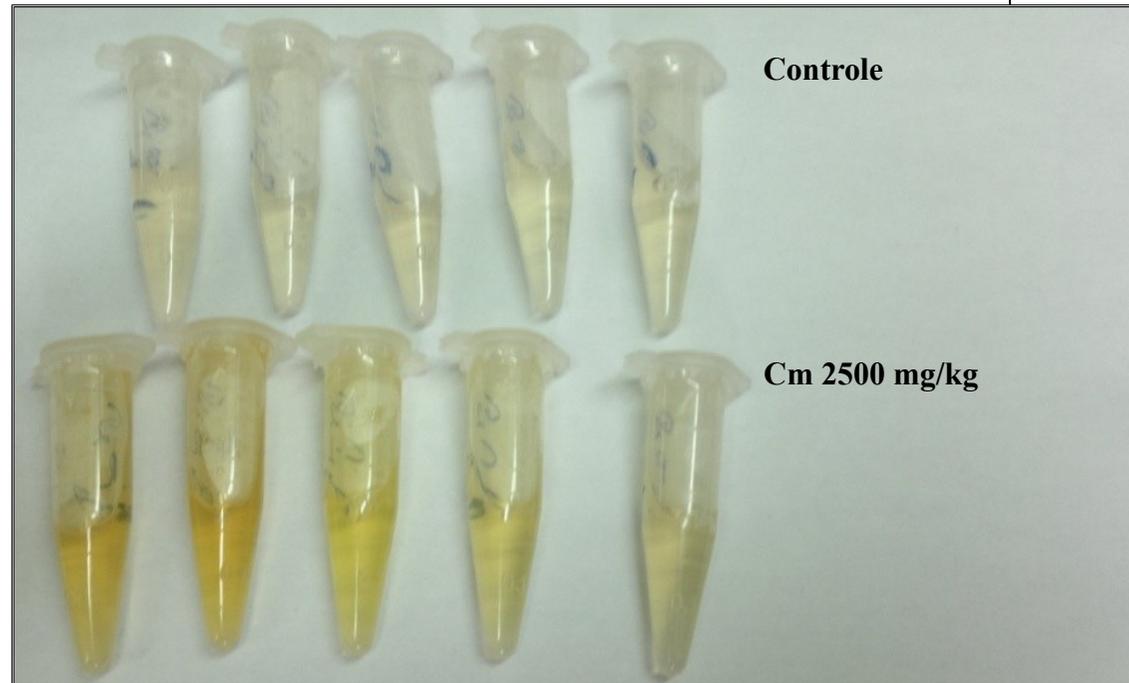


Figura 20. Soro dos ratos tratados por quatro semanas com *C. multijuga* (2500 mg/kg) por via oral observando tonalidade mais escura em relação ao grupo controle.

Tabela 19. Efeito da administração do óleo de *C. multijuga* (Cm 2500 mg/kg) por via oral nos parâmetros globais de avaliação renal em ratos tratados por quatro semanas consecutivas.

Parâmetros	Controle	Cm	Controle	Cm
	♀	♀	♂	♂
		2500 mg/kg		2500 mg/kg
Massa corporal 30 dias (g)	214,4 ± 5,9	196,2 ± 4,7*	352,4 ± 7,4	326,6 ± 13,0
Massa corporal (Δ final - inicial, g)	27,2 ± 4,8	21,2 ± 3,2	35,6 ± 4,5	0,4 ± 13,2*
Área de superfície corporal 30 dias (cm ²)	325,3 ± 5,6	307,6 ± 4,6*	445,1 ± 6,0	424,0 ± 10,8
Área de superfície corporal (Δ final - inicial, cm ²)	26,6 ± 4,5	21,4 ± 3,2	29,1 ± 4,0	0,2 ± 11,0*
Volume de urina em 24 h (mL)	14,0 ± 1,9	21,0 ± 1,0*	11,0 ± 1,0	23,0 ± 1,2*
Consumo de água em 24 h (mL)	26,0 ± 2,4	34,0 ± 2,4*	32,0 ± 2,0	42,0 ± 3,7*
eRFG (mL/min/1,73 m ²)	263,7 ± 9,7	84,8 ± 14,9*	356,6 ± 19,0	108,6 ± 18,6*
Fluxo urinário em 24 h (mL/min)	0,0097 ± 0,0013	0,0146 ± 0,0007*	0,0076 ± 0,0007	0,0146 ± 0,0013*
Clcreatinina (mL/min)	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,11 ± 0,03
Clcreatinina corrigido (mL/g/min)	17,99 ± 2,66	10,93 ± 2,16	66,61 ± 9,31	35,44 ± 9,02*
Clcreatinina corrigido (mL/cm ² /min)	27,17 ± 3,85	17,14 ± 3,32	84,19 ± 11,79	45,87 ± 11,60*
Fração de excreção de sódio (%)	7,41 ± 0,84	2,92 ± 0,31*	30,60 ± 7,26	6,63 ± 2,08*
Fração de excreção de potássio (%)	362,0 ± 45,2	136,4 ± 38,4*	1169,0 ± 185,3	208,4 ± 82,7*

Valores apresentados como média ± erro padrão da média (n = 5/grupo). eRFG – estimativa do ritmo de filtração glomerular; Clcreatinina – *clearance* de creatinina. * Estatisticamente diferente do grupo controle (teste t não pareado, p < 0.05).

Discussão.

7 DISCUSSÃO.

A grande complexidade de insumos de origem natural conduziu a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar e aceitar técnicas cromatográficas *fingerprint* - “impressão digital” - como uma maneira mais robusta de analisar a qualidade de produtos naturais, focalizando a comparação qualitativa e sistemática dos picos obtidos nas diferentes amostras. Desta maneira a amostra, com seus principais constituintes químicos definidos, é assim considerada como “substância ativa”, facilitando a repetibilidade e a credibilidade de pesquisas pré-clínicas, clínicas, farmacológicas e toxicológicas de insumos naturais (WHO, 1991). Em relação à constituição química do óleo de *C. multijuga*, Craveiro et al. (1978), detectou a presença dos ácidos graxos, palmítico e linoléico, entre outros, e, Veiga-Júnior et al. (1997), identificou compostos terpênicos como substâncias essenciais na composição do óleo, sendo que estes compostos encontram-se em misturas de sesquiterpenos (cariofileno, β -bisaboleno e copaeno), por exemplo, sendo resultados semelhantes encontrados por Dias et al. (2012), e que, também foram identificados neste estudo pela cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/EM).

Nos últimos anos, estudos farmacológicos sobre a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do óleo-resina em várias espécies de *Copaifera* justificam sua ampla utilização popular (GOMES et al., 2007). Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade antinociceptiva/antiinflamatória. Segundo Lapa et al. (2003), dentre os parâmetros normalmente avaliados estão a nocicepção (contorções abdominais) e a migração celular (peritonite).

O modelo de contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, avalia a nocicepção periférica, que consiste de estímulos de alta intensidade e resposta nociceptiva de curta duração (BRAGGIO et al., 2002). A diminuição do número de contorções é sugestiva de que o óleo de copaíba interfere com a resposta inflamatória aguda desencadeada por este agente flogístico, inibindo e/ou modulando a produção e a migração de mediadores químicos ao local da lesão. A indometacina, utilizada neste modelo como controle positivo, é um antiinflamatório não esteroide inibidor específico das enzimas ciclooxigenases, inibindo desta forma a produção de prostaglandinas, destas, a prostaglandina E2 tem um importante papel no processo inflamatório e seus níveis aumentam consideravelmente durante a ativação enzimática das ciclooxigenases, efeito indutor, promovendo inflamação e dor (DANNHARDT; KIEFER, 2001). Um dos possíveis mecanismos para a sua atividade antinociceptiva pode ser a inibição das ciclooxigenases pelo óleo de copaíba. Porém, este modelo é insuficiente para a determinação do mecanismo responsável pela

antinociceção devido a sua inespecificidade, pois é sensível a fármacos de ação central e periférica (KOSTER et al., 1959; HENDERSHOT; FORSAITH, 1959).

Já o modelo de inflamação, induzido por carragenina, envolve a migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, tais como óxido nítrico, prostaglandina E2, interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Estes mediadores são capazes de recrutar leucócitos, tais como neutrófilos, em vários modelos experimentais (LORAM et al., 2007). A administração oral do óleo de *C. multijuga* diminuiu o número de neutrófilos, permitindo sugerir a capacidade de bloquear a síntese e/ou ação de mediadores responsáveis pela quimiotaxia, pois, diversos fármacos antiinflamatórios diminuem a migração leucocitária, dentre eles, o antiinflamatório esteroide dexametasona, e, alguns antiinflamatórios não esteroides como a indometacina (SCHIMMER; PARKER, 2001), contudo é limitante por meio desse resultado estabelecer o (s) mecanismo (s) envolvido (s).

Entretanto, tanto a atividade antinociceptiva demonstrada nos testes de contorções abdominais e a redução da migração leucocitária, envolvem mecanismos antiinflamatórios (MORROW; ROBERTS II, 2001), e referências atribuem atividade antiinflamatória do óleo por inibição enzimática das cicloxigenases (COX-1 e COX-2) (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; GOMES et al., 2007), ação esta relacionada aos componentes sesquiterpênicos, β -bisaboleno (ROCHA et al., 2011), e principalmente o β -cariofileno (DIAS et al., 2012; SOUSA et al., 2012), presente em alta concentração neste óleo (>50%). Em adição, Gomes et al. (2010), observou atividade antinociceptiva central e periférica das frações em hexano, clorofórmio e metanol do óleo de *C. multijuga* mediada por receptores opióides, o que pode ratificar o amplo uso popular deste óleo em doenças que envolvem os sintomas como dor (GOMES et al., 2007) e inflamação (CARVALHO et al., 2005; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Portanto confirma-se a atividade antiinflamatória e antinociceptiva do óleo de *C. multijuga*.

Os resultados de toxicidade aguda mostraram que o óleo de copaíba até 4g/kg não produziu morte ou alteração do comportamento dos ratos. Também não modificou os consumos de água e ração no período analisado. Esses resultados mostram que a DL₅₀ do óleo de copaíba por via oral em ratos Wistar está acima de 4g/kg, o que indica baixa toxicidade do óleo.

Plantas do gênero *Copaifera* apresentam muitas semelhanças em suas composições químicas bem como nas suas indicações farmacológicas, o que permite comparações entre as mesmas (LOURENÇO et al., 2009), por exemplo, nos estudos de toxicidade aguda realizados em espécies de *Copaifera* em ratos por Sachetti et al. (2009), do óleo-resina de *C. reticulata*, não verificou toxicidade do óleo nas doses de 300 a 2000 mg/kg. Resultados semelhantes aos de Fernandes et al. (1992), e Gomes et al. (2007), relataram baixa toxicidade aguda por via oral, também para esta

espécie. Fernandes et al. (1992), avaliou também o efeito da exposição do óleo-resina de *C. cearenses* em camundongos expostos a doses de 1250 a 5000 mg/kg, e, estimou a DL₅₀ em 3090 mg/kg. Gomes et al. (2007), estimou a DL₅₀ em camundongos tanto do óleo-resina de *C. reticulata* como também de *C. multijuga* em 3900 mg/kg e 4300 mg/kg, respectivamente, mostrando uma baixa toxicidade aguda destas espécies segundo a escala de Hodge e Sterner (1949) (ANEXOS). Dessa forma os nossos resultados são similares aos obtidos na literatura.

A administração em doses repetidas do óleo de *C. multijuga*, não se observou morte entre os animais, nem sinais visíveis de toxicidade como piloereção, alteração da atividade locomotora e comportamental, durante as oito semanas em que se seguiu, sugerindo inicialmente uma baixa toxicidade deste óleo nas doses utilizadas.

Nos estudos de toxicidade o acompanhamento da massa corporal e consumo de água e ração do animal é um importante indicador da avaliação do efeito de uma substância no organismo (JAHN; GÜNZEL, 1997). O consumo de ração não teve alteração significativamente importante ao longo das oito semanas de tratamento. Dados semelhantes foram encontrados por Rio (2001), onde o consumo de ração em ratos tratados por via oral com o óleo de *C. reticulata* (2,47 a 4,84 mL/kg) por 31 dias, não se alterou. Outro estudo de toxicidade realizado com o óleo da *C. reticulata*, (300 a 2000 mg/kg) por, Sachetti et al. (2009), não observou diferença no consumo de ração dos animais tratados por via oral. Podendo sugerir assim, que, a administração do óleo-resina de *C. multijuga* em ratos também não interferiu de modo importante neste parâmetro.

O aumento do consumo de água observado nesse estudo pode estar relacionado a um efeito compensatório, tendo em vista que os animais tiveram maior volume de urina eliminada bem como, do fluxo urinário, o que se relaciona inicialmente à ação diurética atribuída ao óleo de *C. multijuga* (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; TAVARES et al., 2006). A ingestão de água é controlada pela sensação de sede, e o centro de controle da sede, localizado no hipotálamo, é ativado com o aumento da pressão osmótica plasmática, e, quando há uma diminuição do volume extracelular, esta sensação ocorre quando o organismo necessita aumentar o volume fluido corporal (CARVALHO; ZANARDO, 2010).

Seguindo a resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - um parâmetro a ser avaliado em estudos de toxicidade de doses repetidas é o hemograma completo. Este parâmetro avalia quantitativamente e qualitativamente os elementos celulares do sangue, sendo indispensável no diagnóstico e controle evolutivo de doenças crônicas em geral (FAILACE et al., 2009). Como não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, sugere-se que a administração em doses repetidas do óleo de *C. multijuga* não interfere com os parâmetros hematológicos.

Outro conceito também estabelecido pela mesma resolução, para a avaliação de estudos toxicológicos pré-clínicos, é o perfil bioquímico sérico dos animais. Este avalia a integridade celular bem como a função orgânica, ainda que não seja uma medida direta da integridade do ambiente intracelular, podem-se esperar diferentes padrões de alterações no perfil bioquímico como resultado de lesão celular ou disfunção orgânica. Esses padrões refletem tanto o extravasamento de constituintes celulares para o soro, quanto à regulação alterada da absorção, produção ou excreção dos vários componentes séricos (LIMA et al., 2006).

Quanto ao perfil lipídico sanguíneo às alterações dos níveis de triglicerídeos e da fração do colesterol VLDL, nas ratas, bem como o colesterol total e a fração LDL, nos coelhos podem ser associados preliminarmente à presença do ácido palmítico (ácido graxo saturado) componente do óleo de *C. multijuga*, uma vez que o ácido palmítico altera as concentrações de lipoproteínas, principalmente elevando as concentrações da lipoproteína de baixa densidade-LDL colesterol (LIMA et al., 2000). Já o fator mais relevante para o aumento dos níveis séricos de triglicerídeos é o de consumo em excesso de ácidos graxos saturados (PINHÃO et al., 2010), tendo em vista que a administração de doses repetidas do óleo de copaíba elevou o aporte destes componentes, sugere-se que, houve aumento da síntese de triglicerídeos, sendo que, a elevação sérica destes compostos reflete um incremento nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol), estas que são responsáveis pelo transporte destes triglicerídeos para os tecidos periféricos (SCHIAVO et al., 2003).

Na avaliação da função hepatobiliar dados como massa do órgão e atividade enzimática de enzimas hepáticas são dados elucidativos importantes, pois quando o fígado é agredido um reflexo clínico é o aumento de volume, por formação de edema (hepatomegalia), contudo, o melhor indicador do processo inicial de lesão do fígado são os resultados encontrados nas chamadas provas bioquímicas de avaliação do órgão. Os testes bioquímicos séricos mais sensíveis e os de maior representatividade que avaliam o nível de agressão ao fígado são o de determinação sérica de enzimas produzidas em parte pelo fígado ou por outros órgãos como a aspartato aminotransferase (AST), a alanino aminotransferase (ALT), bem como também os níveis séricos da fosfatase alcalina e bilirrubina total (JÚNIOR et al., 2005).

Os valores das aminotransferases não se encontraram elevados, mas os valores da fosfatase alcalina e bilirrubina total estavam significativamente maiores, no grupo Cm 2500 mg/kg de todos os ratos. Onde resultados semelhantes foram obtidos por Botelho et al. (2010) estudando o óleo de *C. officinalis* em houve aumento significativo dos níveis séricos da fosfatase alcalina sem, portanto, ter alteração dos níveis de AST e ALT, o que segundo os autores sugere um possível efeito colestático sobre as vias biliares. Noguchi et al. (2002), encontrou resultados também semelhantes

em ratos tratados com o óleo de *C. reticulata*, durante cinco dias, em que não houve alteração dos níveis de AST nem de ALT, mas, por outro lado, elevou os níveis séricos de bilirrubina total sugerindo quadro de obstrução biliar (colestase). Os níveis séricos não alterados das aminotransferases, bem como, as estruturas tissulares hepática preservadas, sugerem assim, que, o tratamento com o óleo de *C. multijuga* possivelmente não interferiu na função hepática. Porém o aumento associado dos níveis séricos, tanto da fosfatase alcalina, quanto da bilirrubina total, podem ser sugestivos de efeito colestático deste óleo que deve ser investigado em maiores detalhes a posteriori.

Para a avaliação de dano celular de músculo esquelético e miocárdio um dado importante utilizado é a dosagem sérica da lactato desidrogenase (LDH), pois esta enzima encontra-se ricamente concentrada no músculo esquelético e no miocárdio, bem como também no fígado. Os níveis de LDH teciduais são, aproximadamente, 500 vezes maiores do que as obtidas no soro em lesões nestes tecidos (MOTTA, 2003). Os níveis desta enzima encontraram-se elevados. Dado semelhante foi obtido por Mirghazanfari et al. (2012), no tratamento via oral com extrato de "*Khosharizeh*" (0,5 a 5 mg/kg) nome popular de *Echinophora platyloba* DC - *Apiaceae*, espécie que apresenta sesquiterpenos como um dos seus constituintes químicos mais importantes. Neste estudo foi observado aumento da LDH, podendo indicar uma possível miopatia e um potencial dano na musculatura esquelética em ratas, contudo não houve alterações histopatológicas que sugerissem alterações cardíacas, nem musculares. Outro estudo de toxicidade oral em ratos, tratados por três dias utilizando extrato diclorometano (6,4 g/kg), da fração lipídica rica em sesquiterpenos da semente de erva de ferro (*Galeopsis ladanum* L. – *Laminaceae*) não foi observado elevação do LDH, nem alteração histológica do tecido muscular cardíaco, concluindo, assim, que este extrato pode não ser responsável por quadro miotóxico (URIARTE et al., 2009). De maneira semelhante na avaliação histológica do miocárdio não se encontrou alterações histopatológicas, o que se pode sugerir que o óleo da *C. multijuga* possivelmente não induziu efeito miotóxico em ratos.

Em estudos de toxicidade reprodutiva em camundongos, Lourenço et al. (2009), utilizando o óleo da *C. langsdorffii* Desfon (0,3 – 0,9 mL/kg) via oral durante 5 dias, observou que o ganho de massa materno não sofreu alteração causada pelo tratamento por via oral durante a prenhez, portanto, não apresentou toxicidade para as fêmeas tratadas, porém, foi relatada diminuição significativa da massa corporal e comprimento dos fetos. Já Botelho et al. (2010), visualizou no desfecho da prenhez em ratas após administração do óleo de *C. officinalis* (0,63 mL/kg) por via oral, durante 20 dias, que, as ratas não levaram a prenhez a termo, atribuindo a este resultado que houve interferência no processo de decidualização e implantação, impedindo a evolução da prenhez

das ratas. A esta interferência foi atribuído que, por ser o óleo de copaíba comumente descrito como tendo ação similar àquela apresentada pelos antiinflamatórios não esteróides de inibir a ação enzimática das cicloxigenases 1 e 2 (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; GOMES et al., 2007), enzimas estas envolvidas no processo de ovulação e implantação (REESE et al., 2001; HORLOCKER, 2002). Resultados diferentes foram relatados por Sachetti et al. (2011), onde se atribuiu toxicidade materna pela diminuição do consumo de ração e ganho de massa corporal, durante o 6º ao 19º dia da gestação, em ratas tratadas com o óleo de *C. reticulata* Ducke (500 – 1250 mg/kg) por via oral, como, também visualizou discreta diminuição da massa absoluta dos fetos, sem, contudo, relacionar este dado, com efeito, embriotóxico, tendo em vista que, não foram observadas más formações, concluiu que o óleo de *C. reiculara* Ducke não possui efeito teratogênico.

Preconiza-se que substâncias químicas que passam da circulação materna para os fluidos uterinos e penetram no embrião no período de pré-implantação podem causar a morte do embrião, ou, a sobrevivência sem danos, pois, nesta situação, as células tronco tem a capacidade de substituir células danificadas, resultando em desenvolvimento embrionário normal (CARLSON, 1996). No entanto, teratógenos que passam à barreira placentária podem não ser letais ao embrião, mas podem causar desvios de desenvolvimento, como malformação congênita, retardo do crescimento, déficit funcional e comportamental. Sesquiterpenos presentes na composição do óleo de copaíba atravessam a membrana placentária, e já foram identificados em plantas tóxicas como a erva dos bálsamos (*Dittrichia graveolens* - *Asteraceae*) (LANZETTA et al., 1991). A administração do óleo de *C. multijuga*, nas doses e período estudado, apresentou toxicidade materna, mas não causou letalidade nem teratogenicidade na prole das ratas tratadas, nem interferiu nas demais variáveis reprodutivas, sugerindo ser seguro o seu consumo durante o período de gestação em ratas. Entretanto estudos em maiores detalhes serão necessários.

Nos experimentos de desempenho reprodutivo de ratos não houve diferença significativa dos parâmetros entre os grupos controle e tratado inclusive no índice de prenhez. Esse índice reflete a capacidade do macho de fecundar a fêmea (GUPTA et al., 2001), mostrando que o óleo não interferiu na maturação e na viabilidade do espermatozóide.

Atualmente há necessidade de estudos longitudinais no que se refere à toxicologia reprodutiva, abrangendo não só alterações estruturais, mas também modificações funcionais, como o desenvolvimento de características físicas desde os primeiros dias de vida e até estudos de comportamento animal (HOLLENBACH et al., 2010).

Segundo Peters e Guerra (1995), um desenvolvimento pós-natal normal é geralmente observado quando o percentual de sobrevivência dos recém-nascidos e seu crescimento são

semelhantes aos obtidos nos animais controle. Os parâmetros comportamentais analisados foram utilizados para verificar possíveis ações deletérias do óleo de copaíba sobre o desenvolvimento comportamental e neurológico da prole (CARLINI et al., 1988). Os resultados encontrados são sugestivos de que a administração do óleo de copaíba nos machos durante oito semanas não interferiu com o processo de desenvolvimento da prole gerada por estes animais.

O efeito tóxico de derivados de plantas é avaliado a partir de alterações do peso de órgãos vitais e não vitais dos animais, como, por exemplo, os órgãos reprodutores. No sistema reprodutor masculino, a perda de peso das gônadas, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, que inferem também na diminuição da produção de espermatozoides, são considerados critérios padrões para a caracterização de agentes tóxicos, que provavelmente causam efeitos adversos nos indivíduos tratados (REBOREDO et al., 2007), o que não foi detectado nos grupos tratados com o óleo de *C. multijuga* em relação ao grupo controle.

O processo espermatogênico pode ser reduzido por interrupção do padrão de divisões das células tronco, degeneração e fagocitose das células do tecido germinativo, retardo na espermatogênese e descamação das células germinativas, que podem ocorrer isoladamente ou em associação no parênquima testicular por privação hormonal ou efeito tóxico de substâncias químicas (MOURA et al., 2006). Mas com relação à análise histológica dos testículos, verificou-se manutenção das características morfológicas gerais dos grupos tratados em relação ao grupo controle, mostrando que o padrão de organização do epitélio seminífero se apresentou sem alterações evidentes, em qualquer comparação. As evidências apontam para uma ausência de efeitos contraceptivos por via oral do óleo de *C. multijuga*, podendo-se sugerir, frente aos dados encontrados, que o óleo de copaíba não interfere no desempenho sexual dos machos.

A ação diurética do óleo de *C. multijuga* pode estar relacionada aos seus constituintes terpênicos tendo em vista que estes compostos são encontrados em outras plantas e por possuírem semelhanças em suas composições dos seus metabólitos secundários possivelmente podem apresentar efeitos semelhantes no organismo o que permite comparações entre as mesmas. Plantas como: salsa parrilha (*Smilax spp* - *Smilacaceae*), erva de pedra (*Herniara glabra* L. - *Caryophyllaceae*), vidoeiro de prata (*Beluta pendula* Roth - *Betulaceae*) e cavalinha (*Equisetum arvense* L. - *Equisetaceae*), induzem o efeito diurético por irritação do epitélio renal (SIMÕES et al., 2004), bem como o óleo do zimbro (*Juniperus communis* L. - *Cupressaceae*) que foi usado em doenças do aparelho geniturinário, mas por ter certa nefrotoxicidade, que se manifesta por ação irritante sobre o epitélio renal, deixou de ser utilizada, e a alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* - *Fabaceae*) - mesma família da *Copaifera* - inibe fortemente a enzima 11 β -hidroxi-esterol-desidrogenase que intervêm na metabolização dos esteroides (5 β -redutase e a 3 β -hidroxi-esterol-desidrogenase).

Assim, ao nível renal há aumento do teor de cortisol com ativação dos receptores mineralocorticoides com o que se dá a reabsorção do sódio, para além da redução na metabolização da aldosterona, desoxicorticosterona e glicocorticóides com subsequente acumulação destes compostos (CUNHA, 2005).

A irritação do epitélio renal é sugestiva de uma lesão inicial glomerular, tubular, intersticial ou vascular, onde todo o néfron pode sofrer lesão irreversível devido à ligação intrincada das várias porções que o constituem (FREITAS, 2010). Estes néfrons são substituídos por tecido fibroso, que na maioria dos casos a causa pode não ser determinada. Esta lesão tende a acarretar várias alterações em outros departamentos do organismo, como no sistema endócrino, no equilíbrio ácido base e hidroeletrólítico, (GRAUER et al., 2009). Este distúrbio consiste no aumento anormal das concentrações de produtos residuais nitrogenados não proteicos no sangue, detectados bioquimicamente como elevação nas concentrações séricas de creatinina e ureia (BARBER et al., 2004). A maioria da creatina produzida pelo organismo é filtrada pelos rins e excretada por eles, tornando-se assim um indicador bioquímico da função renal (BRITO et al., 2005). Todos os animais dos grupos (Cm 2500 mg/kg) - ratos e coelhos - apresentaram concentrações séricas de creatinina estatisticamente maiores, e, nos ratos, concentrações urinárias significativamente menores, o que somado aos valores menores do *clearance* de creatinina corrigido (mL/g/min e mL/cm²/min), e a estimativa do ritmo de filtração glomerular (eRFG), significativo para os ratos, em relação ao grupo controle, são indicativos de que a taxa de filtração glomerular (TFG) foi comprometida, pois a TFG é uma das mais importantes ferramentas na análise da função renal, sendo também um indicador do número de néfrons funcionais (SODRÉ et al., 2007). Nos ratos, mesmo não havendo diferenças estatísticas quanto à massa absoluta e relativa dos rins bem como alterações a nível histológico, tem-se de se considerar que o comprometimento renal é avaliado também conforme o estadiamento do grau de insuficiência renal (ANEXOS), segundo Madazzollo et al. (2007), no estágio inicial, como estágio zero, a TFG é > 90 mL/min e não se visualiza lesão renal, mas em estágio mais avançado, como o estágio 1, onde a TFG é semelhante ao estágio zero, se constata lesão mesmo a função renal estando normal, pois, como medida fisiológica, ela já provou ser o mais sensível e específico marcador de mudanças nesta função, sendo largamente aceita como a melhor medida da função renal global (SPANNAUS et al., 2011).

Recentemente considera-se que níveis séricos de cistatina C seriam indicadores melhores da TFG que a creatinina, fato esse que vem sendo confirmado por uma série de estudos (MARTINEZ et al., 2003; FILLER et al., 2005). Por outro lado, alguns poucos estudos não evidenciaram diferença significativa entre as determinações sanguíneas de cistatina C e de creatinina para esse fim (WILLEMS et al., 2003; DANIEL et al., 2004). Existem evidências de que a cistatina C é

produzida de modo constante por todos os tecidos corporais. Sua produção parece não variar entre populações e pelo tempo. Sua medida direta em ratos sugere que é livremente filtrada pelos glomérulos sendo quase completamente reabsorvida e metabolizada nos túbulos proximais (OKAY et al., 2002). A cistatina C, portanto, é um marcador endógeno de função renal considerado muito mais sensível do que a creatinina (MARTINS et al., 2003). A determinação sérica da cistatina C começa a ser usada na prática clínica em todo o mundo, mas ainda não foram completamente esclarecidas suas limitações ou as situações em que está de fato indicada sua aplicação. Tendo em vista que as concentrações séricas deste parâmetro não apresentaram diferenças estatísticas dos ratos tratados em relação ao grupo controle, e enquanto alguns aspectos relativos às suas limitações não estiverem bem estabelecidos, é importante não desprezar a dosagem sérica de creatinina, cujas limitações são bem conhecidas e podem, ao menos em parte, ser contornadas (GABRIEL et al., 2011).

Em nosso trabalho, o efeito diurético do óleo foi mais visível em ratos. Essa diurese induz também perda importante de sódio (hiponatremia) o que, entre outras consequências, induz a desidratação e a hipovolemia (VIEIRA-NETO et al., 2003), bem como, pode refletir na massa corporal e conseqüentemente na área de superfície corporal, pois estas alterações refletem na diminuição de água total do organismo (ÉVORA et al., 1999) efeitos estes constatados pela menor massa corporal (Δ final - inicial, g) e área de superfície corporal (Δ final - inicial, cm^2) do grupo Cm 2500 mg/kg em relação ao grupo controle.

Um dos parâmetros para avaliar a regulação de distribuição de água no organismo é pela determinação dos níveis séricos de albumina, que é responsável por cerca de 80% da pressão oncótica (NAOUM, 2009), bem como os níveis de proteínas totais, um parâmetro utilizado para avaliação de equilíbrio ácido-base e desidratação que leva à hiperproteinemia (MOTTA, 2003). De tal forma, possivelmente houve desencadeamento dos mecanismos compensatórios da perda de água, de sódio ou de ambos, tendo em vista de que não houve diferenças estatísticas na osmolaridade e nas concentrações séricas das proteínas totais, albumina, globulina, sódio, potássio, cloro e magnésio nem nas concentrações urinárias de sódio, potássio e cloro entre os grupos tratados (Cm 2500 mg/kg) em relação aos grupos controle. Nessas ocasiões adversas, rins, glândulas adrenais, cérebro e até o coração são mobilizados para a produção de hormônios tais como a renina, a angiotensina II e a aldosterona, que atuam em cascata, bem como o hormônio antidiurético (vasopressina) (Figura 5), que em conjunto trabalham a fim de evitar maiores perdas de sódio e água no organismo (CHRISTANTE et al., 2011), o que se evidencia pela massa absoluta e relativa maior das adrenais, e maior concentração de aldosterona sérica nos ratos (Cm 2500

mg/kg) o que sugere sinal de aumento de atividade deste órgão, visto que, é comum a hiperplasia em casos de hiperaldosteronismo (MCKENZIE et al., 2007).

Outros dados que corroboram esta ação são os da fração de excreção de sódio (Na^+) e potássio (K^+) dos grupos Cm 2500 mg/kg que se apresentaram significativamente menores em relação ao grupo controle, significando maior retenção sérica destes eletrólitos tendo em vista que a ação da aldosterona visa aumento da reabsorção de sódio (VERLANDER; CUNNINGHAN, 2009). Já a fração de excreção de potássio diminuída pode estar relacionada ao consumo elevado de água (polidipsia) e a excreção elevada de urina (poliúria) consequentes de defeito na reabsorção tubular renal de íons bicarbonato (HCO_3^-) e excreção de hidrogênio iônico (H^+), que podem levar a uma acidose por retenção de H^+ provocando a saída de K^+ do meio intra para o extracelular, aumentando sua concentração sérica (SIMÕES e SILVA et al., 2007).

A quantidade de HCO_3^- filtrada por dia é quarenta vezes maior que a contida no sangue. Portanto, para que o equilíbrio ácido-base seja mantido, o HCO_3^- deve ser reabsorvido. Os íons H^+ secretados no lúmen do túbulo contorcido proximal renal reagem com cerca de 90% do HCO_3^- filtrado, produzindo CO_2 e H_2O , o que é acelerado pela enzima anidrase carbônica IV ancorada na membrana. O CO_2 difunde-se facilmente para dentro da célula. No meio intracelular, Formam-se novamente H^+ e HCO_3^- , esta reação acelerada pela anidrase carbônica II citoplasmática. Os íons H^+ são secretados novamente, enquanto o HCO_3^- deixa a célula pelo lado basolateral mediante um carreador eletrogênico (hNBC = cotransportador humano de Na^+ -bicarbonato (carreador eletrogênico). Figura 21 (SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

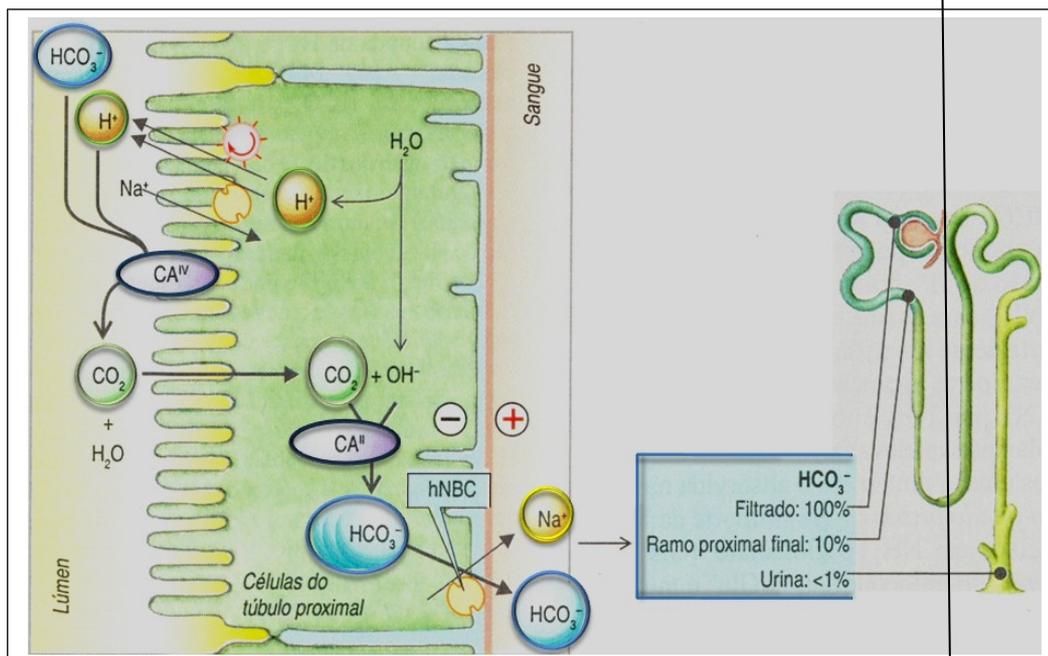


Figura 21: Reabsorção de HCO_3^- . CA = anidrase carbônica; hNBC = co-transportador humano de Na^+ - bicarbonato (carreador eletrogênico).

Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

Quando a velocidade do fluxo urinário se eleva diminui a reabsorção tubular do HCO_3^- levando a excesso de íons H^+ adicionado ao plasma (Figura 22), sendo a maior parte tamponada no compartimento intracelular, e, para que esses íons entrem para o lado intracelular, eles são trocados por íons Na^+ , através do trocador Na^+-H^+ , o que diminui a concentração de Na^+ intracelular, e, conseqüentemente, sua disponibilidade para ser trocado pelo K^+ através da bomba Na^+-K^+ ATPase. Dessa maneira, menor quantidade de K^+ entra nas células e conseqüentemente aumenta extracelularmente, como visto na figura 7 (VIEIRA-NETO; MOYSÉS-NETO, 2003).

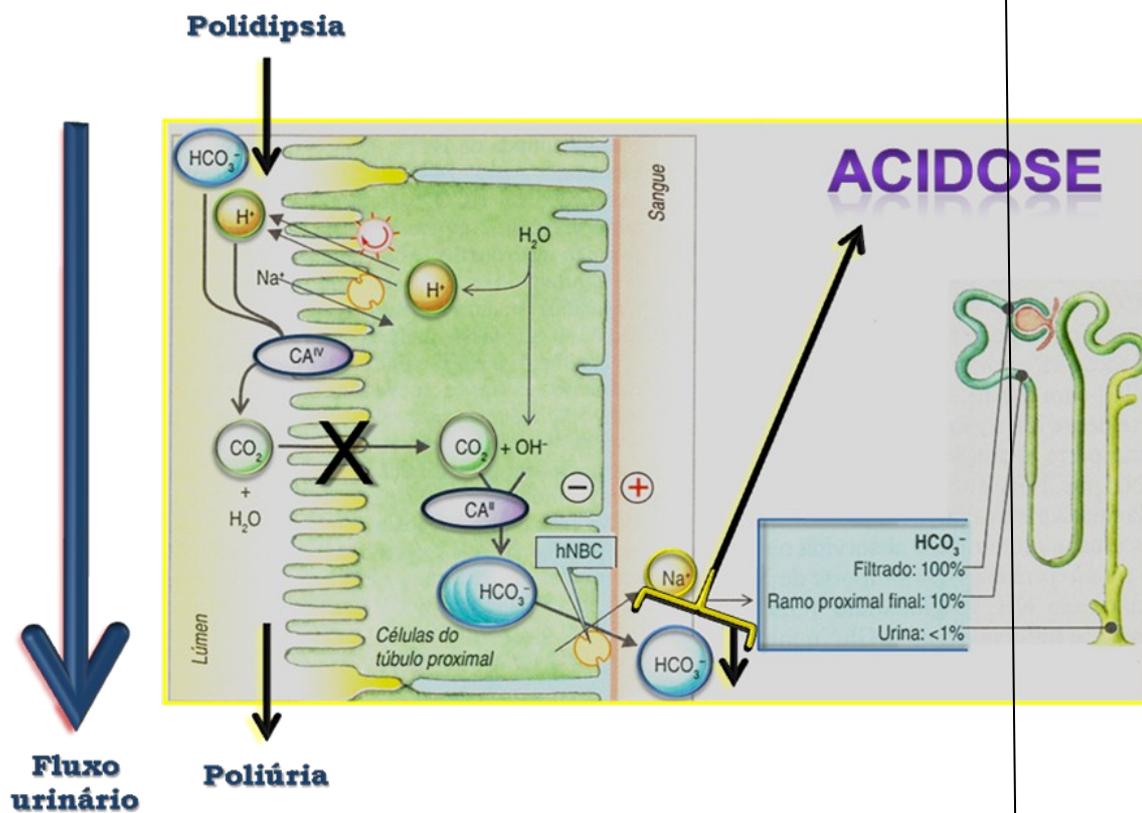


Figura 22: Fluxo urinário, poliúria, polidipsia, reabsorção de HCO_3^- e acidose. CA = anidrase carbônica; hNBC = cotransportador humano de Na^+ - bicarbonato (carreador eletrogênico).

Fonte: (adaptado de SILBERNAGL; DESPOPOULOS, 2003).

Conclusão.

8 CONCLUSÃO.

Os resultados obtidos sugerem que o óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne é seguro por via oral, contudo foi observada, no sistema renal, possível toxicidade que necessita ser investigada em maiores detalhes.

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* possui em sua composição compostos fixos e voláteis semelhantes aos encontrados na literatura;

Como esperado, o óleo-resina de *Copaifera multijuga* apresentou atividade antinociceptiva e antiinflamatória em camundongos Swiss;

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* mostrou baixíssima toxicidade aguda por via oral em ratos;

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* administrado por via oral em doses repetidas em ratos Wistar e coelhos Nova Zelândia produziu apenas alterações pontuais em alguns indicadores hematológicos e bioquímicos;

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* administrado por via oral em doses repetidas de forma geral não interferiu na morfologia macro e microscópica dos tecidos;

No período da gestação, o óleo-resina de *Copaifera multijuga* produziu redução sobre o ganho de massa materno durante a prenhez em ratas, dados estes que necessitam de maiores investigações;

No estudo de performance reprodutiva, o óleo-resina de *Copaifera multijuga* não modificou a capacidade reprodutiva dos machos e nem interferiu com o desenvolvimento da prole;

A administração repetida do óleo-resina de *Copaifera multijuga* em ratos e coelhos produziu nefrotoxicidade, indicada pelo aumento de creatinina sérica, cujo mecanismo necessita ser investigado.

Referências.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, **Allured Publishing Carol Stream**, 2007.
- ADLER, T. The return of thalidomide. **Science News**, v.146, p.424-425, 1994.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17 p.114-140, 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, p.472-508, 2008.
- ALENCAR, J. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - *Leguminosae*, na Amazônia central. 2 – produção de óleo resina. **Acta Amazônica**, v.12, p.79-82, 1982.
- ALMEIDA, E.R.; MELO, A. M.; XAVIER, H., Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and Boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v.14 (2), p.99-102, 2000.
- ANJOS, J.V.; MENDONÇA JR, F.J.B.; COSTA-SILVA, J.H.; SOUZA, I.A.; MELO, S.J. Estudo Preliminar da Toxicidade Aguda e das Atividades Anti-edematogênica e Anti-nociceptiva da 3,4-diidro-2-fenil-6-*para*-flúor-fenil-4-oxo-pirimidina-5-carbonitrila. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27 (3), p.339-44, 2008.
- AZEVEDO, O.C.R.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O. Copaíba: Ecologia e Produção de Óleo-Resina. Documentos 91 - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA**. ISSN: 104-9046, 2004.
- BARBER, P.J.; CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **The kidney. Feline medicine and therapeutics**. Oxford: Blackwell Publishing, 3rd ed., p. 281-303, 2004.
- BARBOSA, K.S.; SCUDELLER, V.V.; ROSA, A.L. Potencial de produção de óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne nos dois períodos climáticos amazônicos na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM. **Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. Edições da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, v. 2. Cap. 12, 2009.
- BARBOSA, K.S.; YOSHIDA, M.; SCUDELLER, V.V. Detecção de óleo-resinas de copaíba adulterados através do índice de refração e da cromatografia de camada delgada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v.19, 2009.
- BARBOSA, R.C.C.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18 (6), p.527, 2003.

BARNES D.G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD); Description and use in health risk assessments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.8: p.471-486, 1988.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; FREITAS, P.C.D.; ZANINI, A.C. Antiinflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.101-109, 1988.

BEDRAN, J.N. **O uso de drogas na gravidez e lactação**, Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro, 1988.

BENESOVÁ, O. Drug treatment in Perinatal Period and Risk of Functional Teratogenicity. EUROTOX'95, **Toxicology Letters**, v. 1, p. 3, 1995.

BOTELHO, N.M.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.I.A.; T.M.B.; LOBATO, R.C.; CORRÊA, S.C. Efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba nos níveis de enzimas hepáticas em soro de ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v. 24(3/4), 2010.

BOTELHO, N.M.; RODRIGUES, B.D.; MATOS, L.T.M.B.; CORRÊA, S.C.; SANTOS, C.A.A. Efeito do óleo de copaíba (*C. officinalis*) na prenhez de ratas. **Revista Paraense de Medicina**, 2010.

BRAGGIO, M.M.; LIMA, M.E.L.; VEASEY, E.A.; HARAGUCHI, M. Atividades Farmacológicas das Folhas da *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p.49-53, 2002.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1/Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA 546 p., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004: **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Brasília, 2004.

BRITO, M.V.H.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.B.; CARBALLO, M.C.S., CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira** – v.20 (3), 2005.

CARLINI, E.A.; MACAUBAS, C.I.P.; OLIVEIRA, M.G.M.; BARBOSA, V.P. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira Santa” e outras). CEME. **Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais**. p.49-66, 1988.

CARVALHO, A. P. L.; ZANARDO, V. P. S. Consumo de água e outros líquidos em adultos e idosos residentes no município de Erechim Rio Grande do Sul. **Revista Perspectiva**. Erechim. v.34, n.125, p. 117-126, 2010.

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

CARLSON, B.M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.424, 1996.

- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.
- CASCON, V. Copaíba - *Copaifera spp.* In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, p.480, 2004.
- CHAN, W. Y.; TAM, P. P.; SO, K. C.; YEUNG, H. W. The inhibitory effects of betamomorcharin on endometrial cells in the mouse. **Contraception Journal**, v.31, n.1, p. 83-90, 1985.
- CHRISTANTE, L. Sede de sal. **Unesp Ciência**, n 17, março de 2011.
- CLARK, D.O. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.3: p.223-251, 1993.
- COCKCROFT, D.W.; GAULT, M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **International Society of Nephrology**, v.16, p. 31-41, 1976.
- COSTA-SILVA, J. H., LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO, A. R.; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p. 425 – 428, 2006.
- CRAVEIRO, A.A.; MAIA, J.G.S.; VAREJÃO, M.J.C.; FILHO, W.W.; MOURÃO, A.P.; ALENCAR, J.W. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de C.. **Acta Amazonica**, v.8, p. 705–706. 1978.
- CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Oficinas gráficas de A. Coelho Dias, S.A. Fundação Calouste Gulbenkian, p. 370, 2005.
- DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, p. 109-26, 2001.
- DEZOTI, C.; ANDRADE, S. C.; WATANABE, M.; SHIBUYA, C. A.; VATTIMO, M. F.F. Alopurinol na insuficiência renal aguda isquêmica em ratos: a recuperação é tempo-dependente? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 27, nº 4 - Dezembro de 2005.
- DEZOTI, C.; WATANABE, M.; PINTO, C.F; NEIVA, L.B.; VATTIMO, M.F. Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.22 (Especial-Nefrologia), p. 490-3, 2009.
- DIAS, D.O.; COLOMBO, M.; KELMANNA, R.G.; SOUZA, T.D; BASSANI, V.L.; TEIXEIRA, H.F.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; LIMBERGER, R.P.; KOESTER, L.S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p.79– 84, 2012.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, p.337-90, 1944.

ÉVORA, P.R.B.; REIS, C.L.; FERREZ, M.A.; CONTE, D.A.; GARCIA, L.V. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido-básico uma revisão prática. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.32, p. 451-469, 1999.

FAILACE, R.R.; FERNANDES, F.B.; FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FAUSTMAN E.M.; ALLEN B.C.; KAVLOCK, R.J.; KIMEL, C.A. Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.23, p. 478-486, 1994.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.73, p. 53-56, 1992.

FERREIRA, P.C.C. **Avaliação da hemodiafiltração no período perioperatório da ovário-salpingo-histerectomia, em cadelas com piometra e refratárias ao tratamento conservador**. São Paulo, 176 p. Tese de Doutorado, FMVZ USP, 2006.

FERREIRA, L.A. **Potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*C. spp.*): um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimary**, Acre. São Carlos, 54 p. Dissertação de Mestrado, Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 1999.

FRANCISCO, S.G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. **Femina**, v.33, n.2, p.89-93, 2005.

FREITAS, C.F.H. **Estadiamento da doença renal crônica em felinos**. Dissertação de mestrado integrado em medicina veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2010.

GANAPATHY, V.; PRASAD, P.D.; GANAPATHY, M.E.; LEIBACH, H.F., Drugs of abuse and placental transport, **Advanced Drug Delivery**, v.1, p.99-110, 1999.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and antiinflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 177-183, 2010.

GOMES N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p. 486-492, 2007.

GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAN, S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n.3, p. 117-123, 1995.

GRAUER, G.F.; NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Urinary tract disorders. **Small Animal Internal Medicine**. St. Louis: Elsevier Mosby, 4th ed, p. 607-636; 653-659, 2009.

GRIEVE, M. **A modern herbal**. London: Tiger books international, p. 221, 1995.

GUPTA R.S., YADAV V.P., DIXIT V.P., DOBHAL M.P. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. **Fitoterapia** v. 72, p. 236-245, 2001.

HENDERSHOT, L.C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenyquinoneinduced writhing in the mouse by weak analgesic and nonanalgesics. **Journal of Pharmacol Experimental Therapeutics**, v. 125, p. 237-240, 1959.

HILL, B. G.; OSTERHOUT, S.; MWILLWT, H. T. *Clostridium*. In: *Zinsser Microbiology* (B. G. Hill, ed.), **Connecticut: Appleton Century Crofts**, p. 636-655, 1992.

HODGE, H.C.; STERNER, J.H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial Hygiene Association**, v.10, p. 93-98, 1949.

HOLLENBACH, C.B.; BORTOLINI, C.E.; BATISTA, J.M.; HOLLENBACH, E.B.; SCHUCH, T.L.; PACHECO, M.H.; MELLO, F.B., MELLO, J.R.. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.845-852, 2010.

HORLOCKER, T.T.; BAJWA, Z.H.; ASHRAF, Z.; KHAN, S.; WILSON, J.L.; SAMI, N. Risk assessment of hemorrhagic complications associated with nonsteroidal antiinflammatory medications in ambulatory pain clinic patients undergoing epidural steroid injection. **Anesthesia & Analgesia**, v. 9, 2002.

JAHN, A.I.; GÜNZEL P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 171-178, 1997.

JÚNIOR, F.A.A.; BRAZ, M.N.; NETO OZÉAS, G.R.; D'ALMEIDA COSTA, F.; BRITO, M.V.H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20 (1), 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings Journal**, v. 18, p. 412-417, 1959.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 103, 2003.

LANZETTA, R.; LAMA, G.; MAURIELLO, G.; PARRILLI, M.; RACIOPPI, P.; SODANO, G. Ichthyotoxic sesquiterpenes and xanthanolides from *Dittrichia-Graveolens*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1121-1124, 1991.

- LEITE, A. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, p. 38, 2001.
- LIMA, F.E.L.; MENEZES, T.N.; TAVARES, M.P.; SZARFARC, S.C.; FISBERG, R. M.. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Revista de Nutrição**. Campinas v. 13(2), p. 73-80, 2000.
- LIMA, E.R.; VASCONCELOS, A.T.; REIS, J.C.; ALMEIDA, E.L.; TEIXEIRA, M.N.; RÊGO, E.W.; COUTINHO, D.G.; ROCHA JUNIOR, M.A. Perfil bioquímico sérico em gatos domésticos (*Felis domesticus*, Linnaeus, 1758) submetidos a diferentes tipos de dietas industrializadas. **Ciência Veterinária dos Trópicos**. Recife-PE, v. 9, nº 2/3, p. 54 - 62, 2006.
- LIMA S.R.M.; VEIGA JUNIOR V.F.; CHRISTO H.B.; PINTO A.C.; FERNANDES P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1048-1053, 2003.
- LISON, L.A. **"Histochemie et cytochemie animals"**, Paris, Gauthiers-Villars, p. 842. 1960.
- LORAM, L.C.; FULLER, A.; FICK, L.G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The Journal of Pain**, v. 8, p. 127-36, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 544, 2005.
- LOURENÇO, A.C.S.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L.; SENSIATE, L.A.; SALLES, M.J.S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.11, n.4, p.407-413, 2009.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO A.C.; VEIGA-JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, nº. 3, p. 429-438, 2002.
- MALONE, R.A. Pharmacological approach to natural products screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, ed. By H. Warner and P. Wolf. Springer – Verlag, Berlin, p. 24 – 53, 1977.
- MARTINS, I. F. B.; SILVA, A. Influência do óleo de copaíba (*Copaifera sp.*) no tratamento de ferida cutânea infeccionada. **Revista de Pesquisa: cuidado é Fundamental-online**, 2ª (Ed. Supl.), p. 526-529, 2010.
- MATTA, A.A. **Flora medica braziliense**. Manaus: Imprensa Oficial, p. 318, 1913.
- MCKENZIE, C.A.; WRIGHT-PASCOE, R.; BOYNE, M.S. Prospective evaluation and characteristics of patients with suspected primary hyperaldosteronism. **West Indian Medical Journal**. Mona, v. 56, n. 3, jun., 2007.
- MELGAARD, B.; MUTIE, D. M.; KIMANI, G. A cluster survey of mortality due to neonatal tetanus in Kenya. **International Journal of Epidemiology**, v. 17, p. 174-177. 1988.

- MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (*Leguminosae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(2B), p. 577-581, 2009.
- MENEGOLA, E.; BROCCIA, M.L.; PRATI, M.; GIAVINI, E. Postcoital antifertility activity of aminoalcohols, **Reproductive Toxicology**, v. 12 (3), p. 371-374, 1998.
- MIRGHAZANFARI, S.M.; HOSSEINZADEH, L.; SHOKOOHINIA, Y.; ASLANY, M.; KAMALI-NEJAD, M. Acute and subchronic toxicological evaluation of *Echinophora platyloba* DC (*Apiaceae*) total extract in Wistar rats. **Clinics (São Paulo) Journal**, v. 67(5), p. 497-502, 2012.
- MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Lipid-driven autacoids: Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In Harman, J.G., Limbird, L.E. (eds) **Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th edn. New York: McGraw Hill, p. 669-683, 2001.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório princípios e interpretações**. 4ª Ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.
- MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P.; SILVA-JÚNIOR, V.A.; SILVA, C.G.C.; CAJU, F.M.; ALVES, L.C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 799-808, 2006.
- NAOUM, P.C. **Doenças que alteram os exames bioquímicos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2009.
- NOGUCHI, A.; BRITO, M.V.H.; DOS REIS, J.M.C.; DIAS, C.S.; EPAMINONDAS, W.A.; AZEVEDO, P.S.R. Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17(2), p. 130-4, 2002.
- OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*C. spp.*) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.3, p. 14-23, 2006.
- PETERS, V.M.; M.O. GUERRA. . Effects of *Dalbergia subcymosa* Ducke decoction on rats and their offspring during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 161-5, 1995.
- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- PINHÃO, R. L.; PAIVA, J. P. V.; TAVARES, F. M. M. ; WILLI, L. M. V. Valores séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol em cães (*Canis familiaris*) com sobrepeso, suplementados na dieta com fibra de maracujá (*Passiflora edulis*). **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 09, n. 09, p. 56 – 63, 2010.
- PLOWDEN, C. Production ecology of copaíba (*Copaifera spp*) oleoresin in the Eastern **Brazilian Amazon Economi Botanic**, v. 57, p. 491-501, 2003.

- RAMOS, M.F.S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 132p. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006**
- REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M.F.; ROCHA, C. B.; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 26, n 1/2, p. 11-17, 2007.
- REESE, J.; ZHAO, X.; MA, W.G.; BROWN, N.; MAZIASZ, T.J.; DEY, S.K. Comparative analysis of pharmacologic and/or genetic disruption of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 function in female reproduction in mice. **Endocrinology**, v. 142, p. 3198-3200, 2001.
- RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; SALVADOR-WADT, P.G.; OLIVEIRA-WADT, L.H. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p. 583-91, 2006.
- RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; SALVADOR-WADT, P.G.; OLIVEIRA-WADT, L.H. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, p. 28, 2004.
- RIO, R.G.W. Atividade antiinflamatória, toxicidade e fitoquímica do óleo-resina de copaíba, provenientes de espécies, e de suas respectivas frações. **Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, 2001**.
- ROCHA, N.F.M.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R.; CERQUEIRA, G.S.; LOPES, A.A.; LEAL, L.K.A.M.; DIAS, M.L.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, p. 525-533, 2011.
- SACHETTI, C.G.; CARVALHO, R.R.; PAUMGARTEN, F.J.R.; LAMEIRA, O.A.; CALDAS, E.D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, *Fabaceae*) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1080-1085, 2011.
- SACHETTI, C. G.; FASCINELLI, M.L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, O.A.; CALDAS, E.D. AVALIAÇÃO da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, *Fabaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(4), p. 937-941, 2009.
- SANTOS A.O.; UEDA-NAKAMURA T.; DIAS FILHO B.P.; VEIGA-JUNIOR V.F.; PINTO A.C.; NAKAMURA C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277- 281, 2008.
- SEBRAE/SUFRAMA/MMA. **Produtos potenciais da Amazônia: Urucum**, p. 236, 1998.
- SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In Harman, J.G., Limbird, L.E. (eds) **Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th edn. New York: McGraw Hill, p. 1649-1677, 2001.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.R.; OLIVEIRA, J. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39. p. 283-288, 2003.

SILVA, E.J.R.; GONÇALVES, E.S.; AGUIAR, F.J.S.; EVENCIO, L.B.; LYRA, M.M.A.; COELHO, M.C.O.C.; FRAGA, M.C.C.A.; WANDERLEY, A.G. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 332-336, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora UFRGS/editora UFSC, p. 724, 2004.

SIMÕES e SILVA, A.C.; LIMA, C.J.C.A.; SOUTO, M.F.O. Acidose Tubular Renal em Pediatria. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 29, nº 1, 2007.

SOARES, J.G.; VAREÃO, M.J.C.; WOLTER-FILHO, W.; MOURÃO, A.P.; CRAVEIRO, A.A.R.; ALENCAR, J.C. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazonica**, v. 9, p. 65-59, 2003.

SOARES, J.G.; VAREÃO, M.J.C.; WOLTER-FILHO, W.; MOURÃO, A.P.; CRAVEIRO, A.A.R.; ALENCAR, J.C.. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazonica**, v. 9, p. 45-51, 1978.

SOUSA, R.B.; SILVA, R.A.O.; MARQUES, L.G.A.; MORAIS, L.S.; SANTOS, M.R.M.C.; PESSOA, C.Ó. Aplicações do óleo resina de *Copaifera* l. na medicina popular: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC– ISSN: 2237-0722**. São Cristóvão/SE, v. 3, p. 144-155, 2012.

SPANANUS, K.S.; KOLLERITS, B.; RITZ, E.; HERSBERGER, M.; KRONENBERG, F.; VON ECKARDSTEIN, A. Creatinina sérica, cistatina C e proteína β -traço no estadiamento diagnóstico e na predição da progressão da doença renal crônica não diabética. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2011.

SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. **Fisiologia: texto e atlas**. 5ª edição – Porto Alegre: Editora Artmed, p. 170-171; 174-175; 180-181, 2003.

TABORDA, C.; MENEHRT, D.U.; SILVA, C.A. **Manual de Técnicas de Laboratório**. Instituto de Ciências Biomédicas – USP. São Paulo, 2004.

TAVARES, J.P.; MARTINS, I.L.; VIEIRA, A.S.; LIMA, F.A.V.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16(3), p. 350-356, 2006.

TESHIMA, C.A.S.; WATANABE, M.; FONSECA, C.D.; VATTIMO, M.F.F. Simvastatina e lesão renal aguda isquêmica em ratos. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25(1), p. 86-89, 2012.

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, p. 808-812, 2002.

URIARTE, I.; GOICOECHEA, M.; GIL, A.G.; CALVO, I.; LÓPEZ DE MUNIAIN, A.; LÓPEZ DE CERAIN, A. ¿Está *Galeopsis ladanum* L. implicada en la miopatía tóxica detectada tras la ingesta de carne de codorniz? Seguridad alimentaria. **Revista de Toxicología**, v. 26, n. 1, p. 59-63, 2009.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-467, 1963.

VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; ROCHA, W.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (Supl.), p. 733-738, 2008.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química nova**, v. 20(6), 1997.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; ROSAS E.C.; CARVALHO M.V.,;HENRIQUES M.G.M.O.; PINTO A.C. Chemical composition and antiinflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VERLANDER, J.W.; CUNNINGHAM, J.G. **Fisiología renal. Fisiología veterinaria**. (4ª ed.). Barcelona: Guanabara Koogan, p. 409-442, 2009.

VIEIRA NETO, O.M.; MOYSÉS NETO, M. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico. **Medicina, ribeirão preto**, v. 36, p. 325-337, 2003.

VIRIATO, E. P.; BIANCHETTI, E. S.; COSTA DOS SANTOS, K.; VAZ, A. F.; VIEIRA CAMPOS, R.M.; PEREIRA, A.P.; BEZERRA, R.M.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. **International Journal of High Dilution Research**, v. 8(26), p. 9-1, 2009.

WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, p. 3-61, 1980.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines**, Munich, 28.6.1991, Geneva, 1991.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.

YUNES, R.A.; CECHINEL, F.V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes, R.A., Calixto,

J.B. (eds.). **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**, Chapecó: Argos, p. 17-46, 2001.

ANEXOS



HERBÁRIO INPA
Manaus-Amazonas-Brasil

LEGUMINOSAE-CAES

INPA: 233154

Copaifera multijuga Hayne

Det.: Ramos, J.F. - Jun 2009

Nome vulgar: copaíba

Brasil, Amazonas, Nhamundá

Latossolo amarelo de floresta de terra firme sobre relevo ondulado.

Árvore de No. 657 da ha 1, com 180cm de CAP, 10m de altura do fuste e 21 m de altura total. Dosséis contínuos em muitos casos abertos deixando algumas clareiras, onde o sub-bosque é denso devido a uma maior intensidade nos processos sucessionais. Botões florais brancos esverdeados.

Coelho, L.S. 329

23/04/2009

& Revilla, J.; Oliveira, J.G. de; Lima, J.

BRAHMS



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
HERBÁRIO INPA
Avenida André Araújo, 2936 - Caixa Postal: 478 - 69083-000 - Manaus/Amazonas/Brasil
Fone: (092) 3643-3331; 3643-3125 E.mail: chicon@inpa.gov.br

Manaus, 25 de março de 2010.

DECLARAÇÃO DE INCORPORAÇÃO DE MATERIAL BOTÂNICO NO HERBÁRIO INPA

Declaramos para os devidos fins que recebemos amostras botânicas férteis coletadas por Luiz de Souza Coêlho dentro do Projeto "Finep nº 0109026400 – Desenvolvimento de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) em cápsula mole", que foram registradas e incorporadas ao acervo do Herbário INPA, número 233.154, conforme registro anexo.

Atenciosamente,

Carlos H. Franciscan
Curador do Herbário INPA
Mat. 0388041



PCAC
PROGRAMA DE COLEÇÕES
E ACERVOS CIENTÍFICOS

Ministério da
Ciência e Tecnologia



File :C:\msdchem\1\data\2013_03_25\OLEO COPAIBA MET DIL 50.D
Operator :
Acquired : 14 Apr 2013 13:33 using AcqMethod copaiba.M
Instrument : GC-MSD
Sample Name: oleo copaiba met dil 50
Misc Info : split 1:50
Vial Number: 1

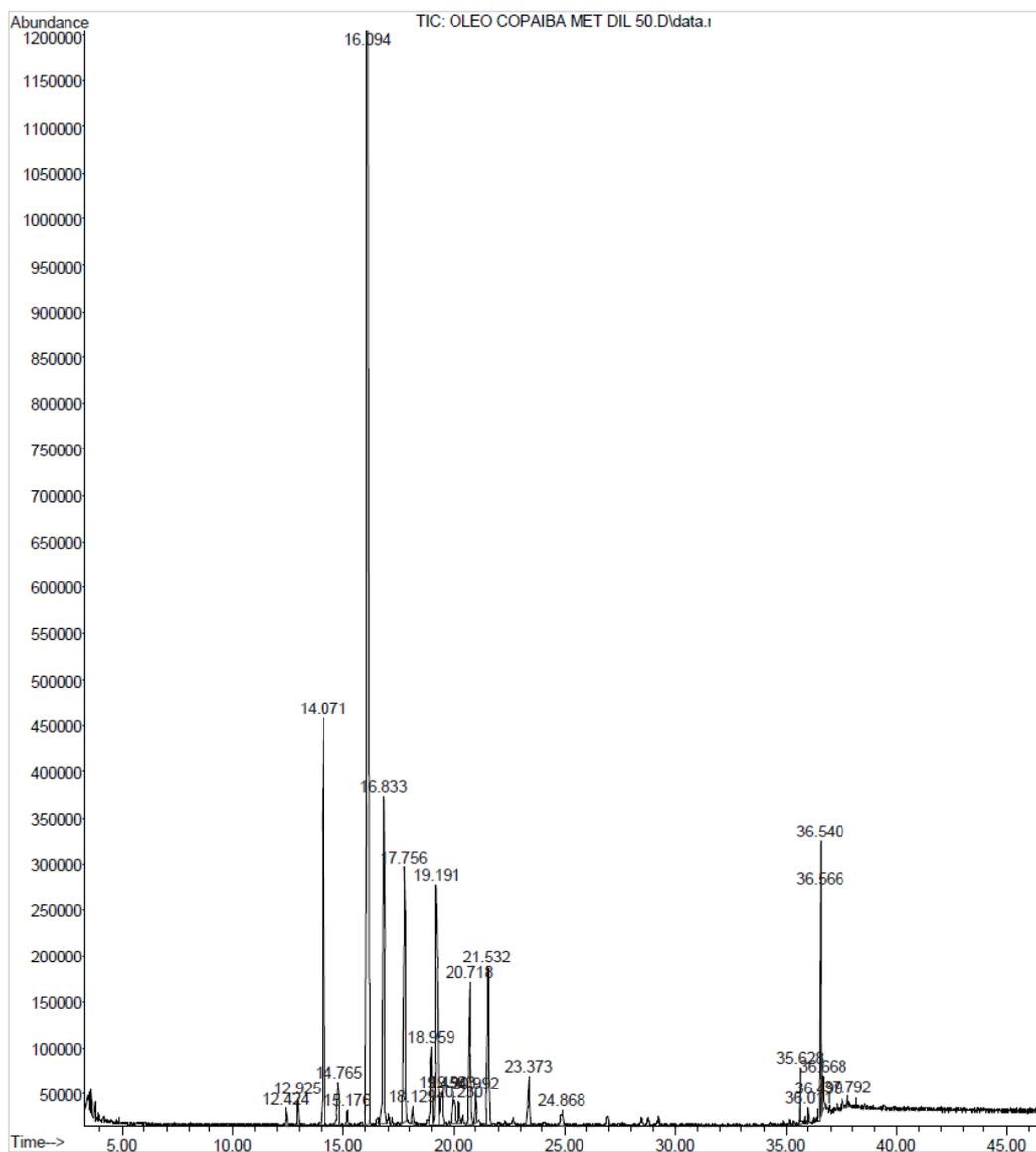


Figura. Cromatograma do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne obtida por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 30 de setembro de 2011.

Ofício nº 406/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.027253/2011-11

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Desenvolvimento, validação de metodologia analítica, avaliação da atividade anti-inflamatória e segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) - copaíba".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE; Animais: Ratos Wistar albinos e Camundongos Swiss albinos; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: camundongos 3 meses e ratos 2 a 3 meses; Peso: ratos entre 200-230 gramas e camundongos entre 30-40 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 296 animais.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansem
Prof.ª Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 08 de março de 2012

Ofício 410/12

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE
Processo nº 23076.051674/2011-55

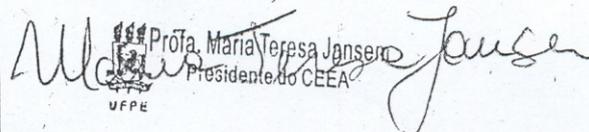
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **“Desenvolvimento, validação de metodologia analítica, avaliação da atividade anti-inflamatória e segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) - copaíba.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA
UFPE

Observação: Animais: Coelhos, Linhagem: coelhos Nova Zelândia brancos (*Oryctolagus cuniculus*); Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: 2 a 3 meses; Peso: 600 – 1100g; Nº de Animais previsto no projeto: 20 animais.

Tabela: Classificação Quanto ao Grau de Toxicidade.

Categoria de Toxicidade	DL₅₀ – Rato (via Oral)
Extremamente tóxico	< 1mg/kg
Altamente tóxico	1-50 mg/kg
Moderadamente tóxico	50-500 mg/kg
Ligeiramente tóxico	0,5-5 g/kg
Praticamente não tóxico	5-15 g/kg
Relativamente atóxico	> 15 g/kg

Fonte: HODGE, H.C., STERNER, J.H. Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Journal* 10: 93–98, 1949.

Estadiamento e classificação da doença renal crônica

Estágio	Filtração Glomerular (ml/min)	Grau de Insuficiência Renal
0	> 90	Grupos de Risco para DRC Ausência de Lesão Renal
1	> 90	Lesão Renal com Função Renal Normal
2	60 – 89	IR Leve ou Funciona
3	30 – 59	IR Moderada ou Laboratorial
4	15-29	IR Severa ou Clínica
5	< 15	IR Terminal ou Dialítica

IR = insuficiência renal; DRC=doença renal crônica.

Fonte: JÚNIOR, J. E. R. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* Volume XXVI - nº 3 - Supl. 1 - Agosto de 2004.

Trabalho aceito pela *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (RBFAR) em 05/05/2014.

Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* Hayne (*Fabaceae*) oil on reproductive performance of male Wistar rats.

Eduardo S. Gonçalves¹, Juliano R. Silva¹, Camila L. Gomes², Melissa B. L. Nery², Daniela M. A. F. Navarro³, Geanne K. N. Santos³, Jacinto C. Silva-Neto⁴, João H. Costa-Silva⁵, Alice V. Araújo⁶, Almir G. Wanderley^{1,2*}

¹*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-520, Recife, PE, Brazil.*

²*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.*

³*Departamento de Química Fundamental Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-560, Recife, PE, Brazil.*

⁴*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50.760-420, Recife, PE, Brazil.*

⁵ *Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.*

⁶ *Departamento de Saúde Coletiva - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.*

Abstract: Copaiba oil, extracted from *Copaifera multijuga* Hayne, *Fabaceae*, is widely used for medicinal purposes, especially in inflammatory processes. However, there is no report about its effect on reproductive performance when it is used in repeated doses orally. The present study evaluated the effects of the oral administration of Copaiba oil (at the doses of 200, 500 or 2500 mg/kg) or water (control) for eight weeks in male Wistar rats. Treated males were mated to untreated female and some parameters, such as fertility rates, the absolute and relative mass of accessory sexual organs and their histology and development of the offspring were evaluated. Chemical analysis revealed the presence of 22 components accounting for 99.11% of the Copaiba oil. The major compounds identified were sesquiterpenes. The reproductive toxicology results indicate that there was no difference in the treated groups when compared to the control group in any of the parameters, suggesting that the oral treatment with the oil of *C. multijuga* for eight weeks does not affect reproductive performance of male Wistar rats.

Keywords: *Copaifera multijuga* oil, reproductive performance.

Introduction

Copaifera multijuga Hayne (*Fabaceae*) is one of the most used medicinal plant in Brazil (Veiga-Júnior & Pinto, 2002). The oleoresin extracted from its trunk, the Copaiba oil, can be found in almost all fairs, herbal and natural products popular markets nationwide (Maciel et al., 2002).

Phytochemical studies showed that *C. multijuga* oil presents fatty acids (palmitic and linoleic acids) and also mixtures of sesquiterpenes (Craveiro et al., 1978). The sesquiterpene caryophyllene have been shown to be the main component, and it is the most used biomarker for the authenticity of this plant (Soares et al., 2003).

The popular use of Copaiba oil as an anti-inflammatory and healing agent is reported since the sixteenth century and occurs in all regions of Brazil. The oil or its ointments is administered orally or by topical application (Maciel et al., 2002). Pharmacologically, Copaiba oil has been shown to present anti-inflammatory (Carvalho et al., 2005, & Veiga-Júnior et al., 2007), antitumor (Lima et al., 2003), antimicrobial (Tincusi et al., 2002 & Santos et al., 2008) and antinociceptive activities (Gomes et al., 2007).

However, the use of medicinal plants and their components may cause adverse effects (Reboredo et al., 2007), thus characterizing a serious problem of public health. These adverse effects, as well as the possible synergistic action with other drugs, are quite common. Toxicological tests assess the effects of the treatment in many organs (Barnes & Dourson, 1998), as well as the influence of the treatment on reproduction (Clark, 1993). These parameters are used to characterize the dose-response relationship and also help to choose the doses to be used in studies of chronic exposure to certain substances (Barnes & Dourson, 1998).

The male reproductive system is very sensitive to the action of harmful factors and the exposure to certain agents can cause changes in these organs that impair the reproductive competence of the individual (Reboredo et al., 2007). The action of a toxic agent can interfere with sexual maturation, the production and transport of gametes, the spermatogenic cycle, the sexual behavior and/or fertility (Kimmel et al., 1995).

Considering the popular use, the great market for the sale of Copaiba oil and the lack of information about its reproductive toxicity, this study aims to evaluate the effects of the treatment with *C. multijuga* oil on male reproductive system of rats subjected to oral treatment for eight weeks, as well as on the postnatal development their offspring.

Materials and methods

Plant material

The plant species (*Copaifera multijuga*, Hayne), Fabaceae was collected from their habitat nature, in the Amazon region (Nhamundá - AM), Brazil (S 02°11'09" W 56°42'46") in April 2009. The voucher specimen of the plant was identified by botanist Ramos, J.F. and deposited at the *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia* (INPA) herbarium, under the number 233154/2009. The *C. multijuga* Hayne oil was provided by Pronatus, Manaus-AM, Brazil. The density of this oil (0.9945 g/ml) was determined to calculate the volume to be administered to the animals.

Animals

Adult male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing 310–340 g, and 200–240 g, respectively, were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology from Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil. Animals were maintained at a controlled temperature (22 ± 2 °C) under a 12 h light–dark cycle. Commercial food (Labina®) and water were available *ad libitum*. All the experimental protocols were submitted to and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco, under license 027253 in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Chemical analysis of the Copaifera multijuga – fingerprint

The analysis of *C. multijuga* was performed on a gas chromatograph (Agilent 7890A) coupled to a mass spectrometer (Agilent 5975C MSD) equipped with a 5% Phenyl Methyl Siloxane column (30 m x 250 µm x 0.25 µm, Agilent HP - 5MS). The carrier gas used was helium at a constant flow of 1 ml per minute. The initial temperature of the oven was 40 °C (maintained for 1 minute) and it was increased to 105 °C at a rate of 50 °C/min, then

increased to 150 °C at a rate of 1.5 °C/min and finally raised to 280 °C at a rate of 30 °C/min. The column was maintained at the final temperature for 10 minutes to ensure the elution of all components. The injector was maintained at 270 °C and used in the 1:50 Split. The ionization source was preserved at 230 °C and the ionization potential was 70 eV. The retention indices (RI) were determined for the components of the oil by co-injection of the sample with a homologous series of linear hydrocarbons (C8 to C30) and subsequent application of Van den Dool and Kratz equation (1963). The constituents were initially identified by comparing the calculated RI to those published in the literature (Adams, 2007). Their identities were confirmed by comparing the mass spectra obtained with those found in NIST library, Adams and the MassFinder4 GCMS and other literature data.

Chronic treatment and reproductive performance

Adult naïve male rats were randomly divided into four groups (n = 5/group) and then treated by oral route with *C. multijuga* (at the doses of 200, 500 or 2500 mg/kg) or water (control) for eight consecutive weeks. During treatment, the body-weight was recorded weekly, and food consumption and water intake of the animals were recorded every two days. Animals were observed twice daily for signs of toxicity, such as piloerection, hair loss, diarrhea and changes in locomotor activity, and mortality throughout the experimental period. Then, they were transferred to individual cages and were mated with untreated and fertile females (n = 10/group) in natural estrus (sexually receptive) for 5 days (male: female ration, 1:2). The presence of vaginal plug and sperm in the vaginal smear in the next morning were defined the first gestation day. Pregnant rats were allowed to complete their pregnancy to term. During the pregnancy, rats were closely observed twice a day for survival, changes in appearance, behavior, and signs of vaginal bleeding. The day of parturition was designated as day 1 of postnatal life. On the day 4 of postnatal life, litters were culled to seven neonates. In

the cases where fewer than seven pups were delivered, additional neonates were fostered from other litters. After birth the following reproductive parameters were analyzed: duration of pregnancy (day), number of live and dead fetuses, the offspring/dam ratio, fertility index (number of pregnant rats/number of mated females x 100), viability index (number of live pups on day 4 of postnatal life/number of live offspring born x 100), lactation index (number of live pups on day 21 of postnatal life/number of live pups on day 4 of postnatal life x 100). Body weight (g) and length (cm) of the newborn rats was determined on days 1, 4, 7 and 21 of postnatal life. The offspring were closely observed for any external malformation (Silva et al., 2009).

Behavioral parameters of offspring

After birth, one third of the offspring from each group was analyzed for the following behavioral parameters: postural reflex, day of eye opening, day of adult walking and spontaneous ambulation. The pups' postural reflexes were evaluated on 1st and 7th days of life. The pups were put on a plane surface, in supine position, and the righting reflex was measured in seconds. The day of eye opening was determined by the observation of the partial displacement of the palpebral fissure in at least one eye. It was considered day of adult walking when pups ambulated without dragging hind feet and without touching its belly on the floor. The spontaneous ambulation was determined on 20th day postnatal life using a square measuring 30 x 30 cm and divided in nine equal spaces. The pup was put on the central part and during two minutes it was recorded the number of invaded squares (when the pup put at least three feet on the square) (Costa-Silva et al., 2006).

Morphological study

After successful mating, the rats were weighed and euthanized with an excess of thiopental (0.140 g/kg, i.p). Necropsy was made for external macroscopic evaluation of testicles, epididymis, vas deferens and seminal vesicles. These organs were removed and weighed individually. Seminal vesicles and the vas deferens were weighed without fluid. The organ weight was expressed in terms of absolute (g) and relative weight (g/100 g of body weight). For microscopic analysis, these organs were fixed "in totum" in 10% buffered formalin for 48h at room temperature, after fixing each sample was washed with water and immersed in 70% ethyl alcohol for 3 to 4 days, then were embedded in paraffin. Paraffin sections of 5 μ m were obtained and stained with hematoxylin/eosin (HE) and they were subsequently analyzed by a system to capture images MicroDIP/Kacil[®] (Dimech et al., 2006).

Statistical analysis

Results were expressed as mean value \pm standard error of mean (S.E.M). Variances in data for body and relative organ weights and reproductive parameters were checked for homogeneity by Bartlett's method. If the variances were homogeneous, the data were assessed by variance analysis (ANOVA) followed, as necessary, by Newman-Keuls test. When the data could not be assumed to follow a normal distribution, nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test was performed. The fertility, viability and lactation indexes were compared by Fisher's exact test. A probability level of less than 5% ($p < 0.05$) was considered significant. All statistical analyses were performed by GraphPad Prism 5.0.

Results

Chemical analysis of the C. multijuga – fingerprint

The chemical characterization of *C. multijuga* oil identified twenty-two components accounting for 99.11% (Table 1). The major compounds identified were the sesquiterpenes caryophyllene (51.64%), copaene (8.04%), α -trans-bergamotene (7.57%) and germacrene D (6.22%). The Figure 1 represents the chromatographic profile of the oil.

Reproductive parameters

During the eight weeks of treatment with *C. multijuga* (200, 500 or 2500 mg/kg) by oral route, there were no deaths and the treatment did not produce change in body mass gain, behavioral abnormalities or signs of toxicity in the male rats.

Table 2 shows the reproductive parameters obtained from the mating of untreated females and males treated with *C. multijuga*. There was no significant difference in mass gain and time of pregnancy indicators of the treated groups compared to the control group.

After the birth of offspring, we found not the presence of stillbirths, or any fetal malformation, through macroscopic examination outside of the pups of the treated groups and the control group, indicating no effects teratogenic visible externally. Moreover, no significant difference was observed in the offspring/dam relationship and in the percentage of dead fetuses.

Fertility, Viability and Lactation index of the rats treated with *C. multijuga* were the same as those obtained in the control group. In addition, the exposure of male rats to Copaiba oil did not affect the offspring postnatal development (Table 2).

Behavioral parameters of offspring

There was no significant difference in average number of pups alive at birth between the control group and *C. multijuga* 200, 500 and 2500 mg/kg. Furthermore, no significant

difference was observed in the behavioral parameters (postural reflex, day of eye opening, day of adult walking and ambulation) among the groups (Table 3).

Morphological study

The treatment with *C. multijuga* did not change absolute and relative weights of testis, epididymis, seminal vesicle and vas deferens (Table 4).

Microscopic analysis revealed no abnormalities in testis after treatment with *C. multijuga* at doses 500 and 2500 mg/kg. The tissue presented normal spermatogenesis, well-preserved sertoli cells and well-delineated peritubular cells in both control and treated groups. The interstitium were also intact, without inflammatory cell infiltrates (data not shown).

Discussion

In this study, we have assessed the effects of the oral treatment with *C. multijuga* oil on reproductive parameters in male and female Wistar rats.

Regarding the chemical constitution of the *C. multijuga* Hayne oil, Craveiro et al. (1978) have detect the presence of fatty acids, palmitic and linoleic acids, among others. Veiga-Júnior et al. (1997) have identified terpene compounds, and these compounds are mixtures of sesquiterpenes (caryophyllene and β -bisabolene). Similar results were found by Dias et al. (2012). In our study, we have also found similar components.

The great complexity of inputs of natural origin led the World Health Organization to consider and accept chromatographic fingerprint as a more robust way to analyze the quality of natural products, focusing on the qualitative and systematic comparison of individual peaks in different samples. It facilitates the repeatability and credibility of pharmacological and toxicological properties of natural products (WHO, 1991).

Treatment of males before mating and conception may result in infertility, embryonic death and non-specific anomalies in offspring, as well as in reduced birth weight, decreased litter size and delayed postnatal development. The characteristics of the fetus and its development capability and maturity are expressions of the fertilizing capacity of germ cells, successful conception and subsequent intrauterine development. The reproductive toxic effect of plant derived compounds may be also evaluated by changes in weight male reproductive organs. The weight loss of the gonads, epididymis or sexual accessory glands may decrease the production of sperm and it is considered a standard criterion for the characterization of toxic agents (Reboredo et al., 2007). The spermatogenesis can be reduced by discontinuation of standard divisions of stem cells, degeneration and phagocytosis of cells of germinal tissue, delayed spermatogenesis and sloughing of germ cells, which may occur alone or in combination in the testicular parenchyma by hormonal deprivation or toxic effect chemicals (Moura et al., 2006). Moreover, the pregnancy index reflects the ability of the male to fertilize the female (Gupta et al., 2001). In our study, there was no difference in all these parameters among the groups. Moreover, the histological analysis of the testis revealed that the pattern of organization of the seminiferous epithelium presented no obvious changes and that the overall morphology was maintained normal in the treated groups.

The perinatal and postnatal development potential depends on the individual and their ability to meet varied environmental conditions (Hollenbach et al., 2010). There is a need for longitudinal studies concerning the reproductive toxicology, covering not only structural, but also functional changes, such as the development of physical characteristics from the first days of life and even animal behavior studies (Hollenbach et al., 2010). According to Peters & Guerra (1995), a normal postnatal development is generally observed when the percentage of survival newborns and their growth are similar to those obtained in control animals. In our study, these parameters were not altered by the treatment with *C. multijuga*. Additionally, the

behavioral parameters were used to assess possible deleterious actions of *C. multijuga* on neurological and behavioral development of the offspring. The results are suggestive that the administration of *C. multijuga* in males for eight weeks did not alter the development of the offspring generated by these animals.

Taken together, these results shows that the oral treatment with *C. multijuga* oil for eight weeks at the doses of 200, 500 or 2500 mg/ml induces no toxic effects in the male reproductive system, in the animals' fertility nor in this offspring development, suggesting no toxic effects in reproductive performance of the animals.

Acknowledgements

The authors thanks the Pronatus Laboratory for providing the *Copaifera multijuga* Hayne oil, to FINEP for financial support and Rejane de Souza Silva for technical assistance.

Authors' contributions

ESG, JRS, CLG and MBLN contributed in running the laboratory work, analysis of the data and drafted the paper. DMAFN and GKNS contributed in the chemicals analysis. JCSN contributed in the histological analysis. AVA, JHCS and AGW designed the study, supervised the laboratory work and contributed to the critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publ.
- Barnes, D.G., Dourson, M., 1988. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. Reg. Toxicol. Pharmacol. 8, 471-486.
- Carvalho, J.C.T., Cascon, V., Possebon, L.S., Morimoto, M.S.S., Cardoso, L.G.V., Kaplan, M.A.C., Gilbert, B., 2005. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. Phytother. Res. 19, 946-950.

- Clark, D.O., 1993. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. *Toxicol. Methods.* 3, 223-251.
- Craveiro, A.A., Maia, J.G.S., Varejão, M.J.C., Filho, W.W., Mourão, A.P., Alencar, J.W. 1978. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. *Acta Amaz.* 8, 705-706.
- Costa-Silva, J.H., Lyra, M.M.A., Lima, C.R., Arruda, V.M., Araújo, A.V., Ribeiro, A.R., Arruda, A.C., Fraga, M.C.C.A., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G., 2006. Reproductive toxicological study of *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) in female Wistar rats. *Acta Farm. Bonaerense* 25, 425-428.
- Dias, D.O., Colombo, M., Kelmanna, R.G., Souza, T.D., Bassani, V.L., Teixeira, H.F., Veiga-Júnior, V.F., Limberger, R.P., Koester, L.S., 2012. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Anal. Chim. Acta* 721, 79- 84.
- Dimech, G.S., Gonçalves, E.S., Araújo, A.V., Arruda, V.M., Baratella-Evêncio, L., Wanderley, A.G., 2006. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispa* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. *Braz. J. Pharmacog.* 16, 152-157.
- Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.* 109, 486-492.
- Gupta, R.S., Yadav, V.P., Dixit, V.P., Dobhal, M.P., 2001. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Fitoterapia.* 72, 236-245.
- Hollenbach, C.B., Bortolini, C.E., Batista, J.M., Hollenbach, E.B., Schuch, T.L., Pacheco, M.H., Mello, F.B., Mello, J.R., 2010. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 62, 845-852.
- Kimmel, G.L., Clegg, E.D., Crisp, T.M., 1995. Reproductive toxicity testing: A risk assessment perspective. In: Witorsch RJ (Ed.). *Reprod. Toxicol.* New York: Raven Press. 75-98.
- Lima, S.R.M., Veiga-Júnior, V.F., Christo, H.B., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2003. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother. Res.* 17, 1048-1053.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga-Júnior, V.F., 2002. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova.* 25, 429-438.
- Moura, C.S., Guerra, M.M.P., Silva-Júnior, V.A., Silva, C.G.C., Caju, F.M., Alves, L.C., 2006. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 58, 799-808.
- Peters, V.M., Guerra, M.O., 1995. Effects of *Dalbergia subcymosa* Ducke decoction on rats and their offspring during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* 46, 161-165.
- Reboredo, M.M., Lucinda, L.M.F., Rocha, C.B., Queiroz, G.T., Faria, V.C., Vieira, V.A., 2007. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. *Bol. Cent. Biol. Reprod. Juiz de Fora.* 26, 11-17.
- Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Veiga-Júnior, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V., 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103, 277-281.
- Silva, E.J.R., Costa-Silva, J.H., Baratella-Evêncio, L., Fraga, M.C.A., Coelho, M.O.C., Wanderley, A.G., 2009. Reproductive assessment of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* L. in Wistar rats. *Phytother. Res.* 23, 1392-1398.

- Soares, J.G. Vareão, M.J.C., Wolter-Filho, W., Mourão, A.P., Craveiro, A.A.R., Alencar, J.C., 2003. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e lácticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. *Acta Amaz.* 9, 65-59.
- Tincusi, B.M., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Moujir, L.M., Mamani, Z.A., Barroso, J.P., Ravelo, A.G., Hernández, B.V., 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Planta Med.* 68, 808-812.
- Van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463-471.
- Veiga-Júnior, V.F., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., 1997. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quím. Nova.* 20, 612-615.
- Veiga-Júnior, V.F., Pinto, A.C., 2002. O Gênero *Copaifera* L. *Quím. Nova.* 25, 273-286.
- Veiga-Júnior, V.F., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C., 2007. Chemical composition and antiinflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 112, 248-254.
- World Health Organization. 1991. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. Munich, WHO, Geneva.

Table 1. Components of *Copaifera multijuga* oil.

Peak	Compound	RI ^A	RI _{lit} ^B	Area (%)
1	α -Elemene	1338	1344	0.29
2	α -Cubebene	1350	1345	0.48
3	Copaene	1377	1374	8.04
4	β -Elemene	1394	1389	1.00
5	Cyperene	1403	1398	0.26
6	Caryophyllene	1421	1417	51.64
7	γ -Elemene	1433	1434	0.29
8	α -trans-Bergamotene	1435	1432	7.57
9	α -Humulene	1453	1452	5.93
10	Allo-aromadendrene	1460	1458	0.26
11	γ -Muurokene	1476	1478	1.94
12	Germacrene D	1480	1484	6.22
13	β -Selinene	1486	1489	0.85
14	α -Muurokene	1500	1500	0.53
15	β -Bisabolene	1508	1505	3.56
16	γ -Cadinene	1513	1513	0.61
17	δ -Cadinene	1522	1522	4.09
18	Germacrene B	1553	1559	1.32
19	Methylpalmitate	1929	1921	0.4
20	Methylinoleate	2098	2095	1.44
21	(x)- Octadecenoicacid, methylester	2104	-	2.29
22	Methylstearate	2129	2124	0.1
	Unidentified			0.89

^ALinear retention index on BP5; ^BAdams, 2007.

Table 2: Reproductive parameters of untreated females rats and its offspring obtained after the mating with male Wistar rats treated with *Copaifera multijuga* oil (Cm 200, 500 or 2500 mg/kg) for eight consecutive weeks.

Parameters	Control	Cm 200 mg/kg	Cm 500 mg/kg	Cm 2500 mg/kg
Pregnant rats	10	10	10	10
Mass gain during pregnancy (g)	54.1 ± 5.9	53.6 ± 7.7	53.2 ± 5.6	59.8 ± 7.3
Time of pregnancy (day)	21.1 ± 0.2	21.2 ± 0.2	21.0 ± 0.2	21.0 ± 0.2
Number of live fetuses	94	98	91	93
Number of dead fetuses	0	0	0	0
Offspring/dam ratio	9.4 ± 0.6	9.8 ± 0.6	9.1 ± 0.9	9.3 ± 0.8
Fertility index (%)	100	100	100	100
Viability index (%)	100	100	100	100
Lactation index (%)	100	100	100	100
Body mass of the offspring 1st day (g)	6.3 ± 0.1	5.9 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.1
Body mass of offspring 4th days (g)	7.98 ± 0.04	8.11 ± 0.03	8.11 ± 0.04	8.17 ± 0.05
Body mass of offspring 7th day (g)	12.6 ± 0.4	13.0 ± 0.5	12.6 ± 0.3	14.1 ± 0.5
Body mass of offspring 14th day (g)	25.4 ± 0.6	23.9 ± 1.0	25.0 ± 2.5	27.3 ± 0.9
Body mass of offspring 21th day (g)	39.0 ± 1.1	38.9 ± 1.0	37.0 ± 0.8	40.8 ± 1.4
Length of offspring 1st day (cm)	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Length of offspring 4th day (cm)	5.66 ± 0.03	5.76 ± 0.02	5.71 ± 0.02	5.53 ± 0.02
Length of offspring 7th day (cm)	6.56 ± 0.04	6.59 ± 0.04	6.47 ± 0.04	6.65 ± 0.05
Length of offspring 14th day (cm)	8.7 ± 0.1	8.9 ± 0.1	8.7 ± 0.1	8.9 ± 0.1
Length of offspring 21th day (cm)	9.9 ± 0.1	9.8 ± 0.1	9.9 ± 0.1	10.0 ± 0.2

The values are expressed as mean ± S.E.M. (n=10/group). The control group received water. Fertility index = number of pregnant rats/number of mated females x 100. Viability index = number of live pups on day 4 of postnatal life/number of live offspring born x 100. Lactation index = number of live pups on day 21 of postnatal life/number of live pups on day 4 of postnatal life x 100.

Table 3: Behavioral parameters of the offspring of untreated females rats obtained after the mating with male Wistar rats treated with *Copaifera multijuga* oil (Cm 200, 500 or 2500 mg/kg) for eight consecutive weeks.

Parameters	Control	Cm 200 mg/kg	Cm 500 mg/kg	Cm 2500 mg/kg
Number of offspring	24	25	23	22
Postural reflex 1st day (s)	16.45 ± 1.61	12.42 ± 1.59	12.20 ± 1.43	16.21 ± 1.85
Postural reflex 7th day (s)	2.03 ± 0.97	1.65 ± 0.34	1.45 ± 0.29	1.30 ± 0.21
Day opening eyes	14.19 ± 0.04	14.11 ± 0.04	14.39 ± 0.08	14.10 ± 0.04
Day of adult walking	14.40 ± 0.05	14.26 ± 0.06	14.30 ± 0.08	14.24 ± 0.07
Spontaneous ambulation ¹	14.81 ± 0.11	14.67 ± 0.11	14.56 ± 0.12	14.37 ± 0.09

The values are expressed as mean ± S.E.M. (n=22-25/group). ¹Number of frames invaded.

Table 4. Effect of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil (Cm 200, 500 or 2500 mg/kg) for eight consecutive weeks on the mass (absolute and relative) of accessory genital organs from male Wistar rats.

Organs	Control	Cm 200 mg/kg	Cm 500 mg/kg	Cm 2500 mg/kg
Testicles (g)	1.69 ± 0.05	1.60 ± 0.06	1.61 ± 0.04	1.67 ± 0.06
(g/100g)	0.45 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.45 ± 0.01
Epididymis (g)	0.72 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.63 ± 0.03
(g/100g)	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Vas deferens (g)	0.244 ± 0.011	0.232 ± 0.014	0.249 ± 0.028	0.193 ± 0.005
(g/100g)	0.066 ± 0.004	0.062 ± 0.004	0.066 ± 0.007	0.052 ± 0.003
Seminal vesicle (g)	1.35 ± 0.06	1.64 ± 0.15	1.39 ± 0.07	1.32 ± 0.14
(g/100g)	0.36 ± 0.02	0.46 ± 0.05	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.04

The values are expressed as mean ± S.E.M. (n=5/group). The control group received water.

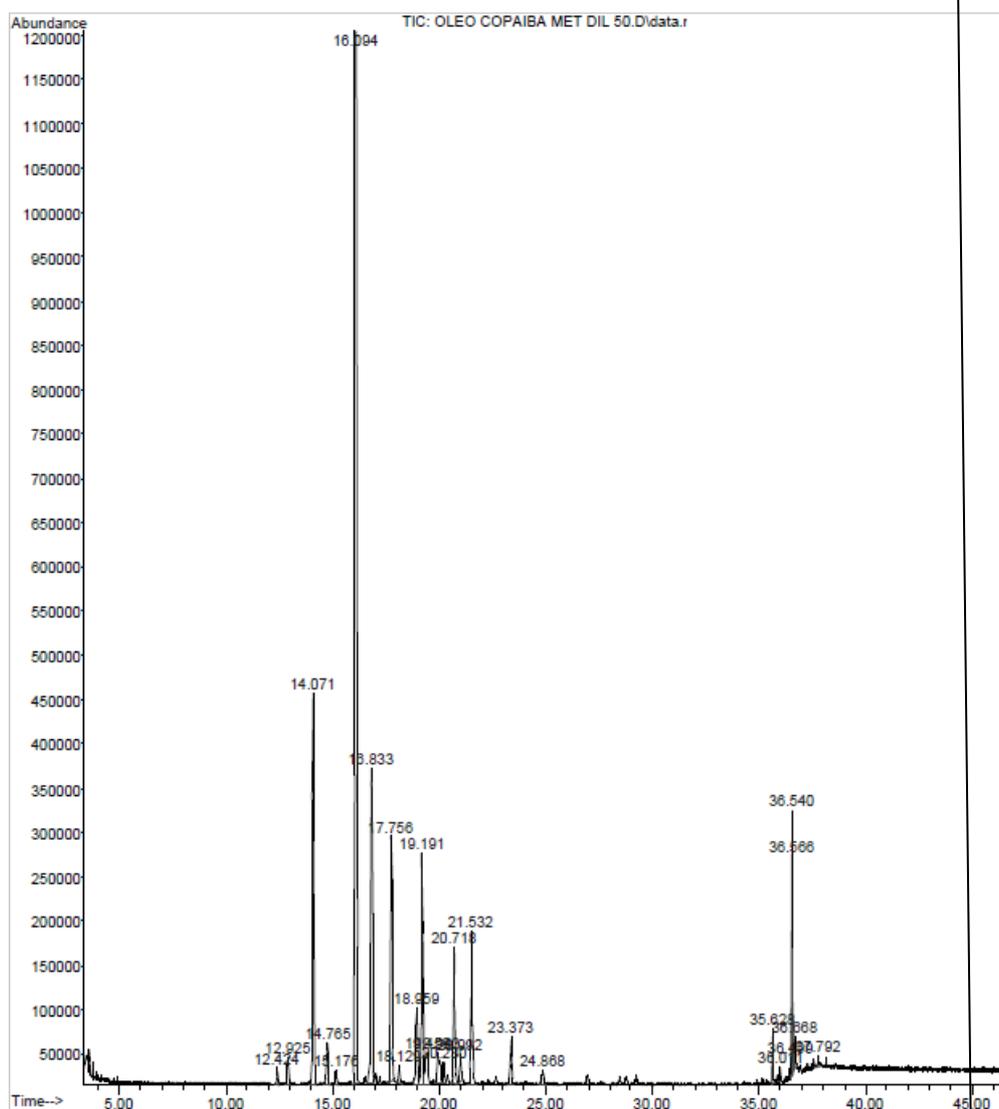


Figure 1. Chromatographic profile of *Copaifera multijuga* oil obtained by gas chromatograph coupled to a mass spectrometer.