

Mirna Maciel d'Auriol Souza

Avaliação do efeito de duas espécies de Copaíba em modelo
experimental murino de alergia alimentar

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

Mirna Maciel d'Auriol Souza

Avaliação do efeito de duas espécies de Copaíba em
modelo experimental murino de alergia alimentar

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia Geral.

Orientadora: Professora Dr^a Denise Carmona Cara Machado

Departamento de Morfologia – ICB - UFMG

Co-orientadora: Professora Dr^a Maria das Graças Lins Brandão

Departamento de Produtos Farmacêuticos – FAFAR – UFMG

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2010

D111a D'Auriol-Souza, Mirna Maciel.
Avaliação do efeito de duas espécies de copaíba em modelo experimental murino de alergia alimentar [manuscrito]. / Mirna Maciel D'Auriol-Souza. - - Belo Horizonte: 2010.
136f.: il.
Orientadora: Denise Carmona Cara Machado.
Co-orientadora: Maria das Graças Lins Brandão.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fabaceae. 2. Óleos Vegetais/uso terapêutico. 3. Óleos Vegetais/farmacologia. 4. Hipersensibilidade Alimentar/terapia. 5. Ovalbumina. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Machado, Denise Carmona Cara. II. Brandão, Maria das Graças Lins. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QV 247



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **MIRNA MACIEL D' AURIOL SOUZA**, nº de registro 2008659717. Às quatorze horas do **dia vinte e cinco do mês de fevereiro de dois mil e dez**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DUAS ESPÉCIES DE COPAÍBA EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR."**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, a Presidente da comissão, Profa. Denise Carmona Cara Machado/Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Denise Carmona Cara Machado/Orientadora
Profa. Maria das Graças Lins Brandão
Prof. Roberto Gonçalves Junqueira
Profa. Vanessa Pinho da Silva

Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG

Indicação: aprovada
Indicação: aprovada
Indicação: aprovada
Indicação: aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2010.

Profa. Denise Carmona Cara Machado/Orientadora Denise Carmona

Profa. Maria das Graças Lins Brandão Maria das Graças Lins Brandão

Prof. Roberto Gonçalves Junqueira Roberto Gonçalves Junqueira

Profa. Vanessa Pinho da Silva Vanessa Pinho da Silva

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Este trabalho foi realizado no laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (NIPE), do Departamento de Patologia Geral e no laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, do Departamento de Morfologia, no Instituto de Ciências Biológicas e no laboratório de Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contamos com apoio financeiro do CNPq e FAPEMIG.

“Ervas e arbustos que enfeitam árvores, campos e margens dos caminhos são tesouros valiosos para a medicina, que poucos olhos veem e poucas mentes compreendem. Por causa deste descaso toda a humanidade sofre imensa perda”.

Carl Von Linneu (1707-1778)

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela iluminação, sem Ele não teria conseguido trilhar este caminho.

Ao meu Anjo da Guarda, por me proteger de todos os males.

Aos meus pais, Glauce e Sérgio, que me amaram, cuidaram de mim e me ofereceram tudo o que tinham de melhor, sempre.

Aos meus irmãos Douglas e Sérgio Bruno, pelo vínculo de amor e amizade, pela paciência e por acreditarem nos meus projetos.

À minha orientadora Denise, pela confiança no meu potencial e pelo carinho.

À professora Graça pela disponibilidade constante e pelo apoio integral.

Aos professores Orivaldo e Marcelo, pela compreensão.

Ao professor Wagner e à professora Rosa, pelo convívio.

À Vânia, Olinda e Jaqueline, pela torcida.

À Olívia, Carol, Renata e Juliana, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de Laboratório pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar, principalmente à Luana e à Maria.

A todos os meus colegas, sem citar nomes, porque sei que vou esquecer alguém, mas cada um sabe como contribuiu, à sua maneira.

A todos os colegas do Departamento de Patologia Geral.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, pelo bom humor sempre presente.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia, pela afetuosa acolhida.

Às minhas amigas Diana e Angélica, pelo grande apoio na graduação.

À minha amiga Kátia, pela verdadeira e eterna amizade.

Ao Lucas, por me fazer acreditar que era possível.

À faculdade de Farmácia, por me mostrar que a realidade pode superar um sonho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por fazer parte de minha vida há anos.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO.....	1
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Trato Gastrointestinal (TGI).....	3
1.2 Alergia Alimentar	7
1.3 Biodiversidade e plantas medicinais brasileiras	12
1.4 Bálsamo de Copaíba	14
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Obtenções dos OR de <i>C. guyanensis</i> e <i>C. langsdorffii</i>	26
3.2. Separação das frações CV e RE	28
3.3. Caracterização dos componentes químicos por cromatografia gasosa	29
3.4 Animais.....	29
3.5. Preparo das rações de caseína e de ovalbumina (OVA) e avaliação do peso corporal	30
3.6 Sensibilização e desafio alérgico	31
3.7 Esquemas de tratamentos	32
3.8 Desenho Experimental	32
3.8.1 Protocolo 1: Tratamentos na ração de caseína e desafio com SCO a 20%.....	32
3.8.2 Protocolo 2: Tratamentos na ração de caseína até desafio e gavagem durante o desafio alérgico	34
3.8.3 Controle sem tratamento e controle ativo.....	35
3.9 Eutanásia.....	35
3.10 Obtenção de soro	36

3.11 Histopatologia	36
3.11.1 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra e sulfomucina (mucina ácida sulfatada).....	37
3.11.2 Avaliação da hiperplasia de mastócitos e infiltrado de eosinófilos	37
3.12 Avaliação do edema do intestino e do peso do tecido adiposo	38
3.13 Dosagens enzimáticas das atividades de neutrófilos e de eosinófilos	38
3.14 Análise do malondialdeído para avaliação da peroxidação lipídica intestinal	39
3.15 Avaliação da IgE anti-OVA	40
3.16 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	42
4.1 Análises cromatográficas	42
4.1.1 <i>Copaifera guyanensis</i>	42
4.1.2 <i>Copaifera langsdorffii</i>	44
4.2 Protocolo 1: Tratamentos na ração de Caseína e desafio com SCO a 20%	48
4.2.1 Avaliação dos OR da <i>C. guyanensis</i> e da <i>C. langsdorffii</i> e suas respectivas frações (RE e CV)	48
4.3 Protocolo 2: Tratamentos na ração de caseína até desafio e gavagem durante o desafio alérgico	68
4.3.1 Avaliação do OR e frações da <i>C. guyanensis</i>	68
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÃO	104

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de colorações mais comuns do óleo-resina de copaíba.....	16
Figura 2: Método de extração do óleo-resina de copaíba, com um trado (técnica não agressiva).....	17
Figura 3: Ilustração do livro <i>Historiae Naturalis & Medicae</i> , publicado em 1648 na Holanda por Piso.....	18
Figura 4: Produtos comercializados com OR de copaíba.....	20
Figura 5: Cromatograma típico de óleos de Copaíba, onde os primeiros picos são de sesquiterpenos e os seguintes formados por diterpenos.....	22
Figura 6: Estruturas químicas do diterpeno ácido caurenóico e do sesquiterpeno -cariofileno.....	23
Figura 7: Os esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano.....	23
Figura 8: Foto da <i>C. guyanensis</i> , Presidente Figueiredo (AM), novembro de 2004.....	26
Figura 9: Foto da <i>C. langsdorffii</i> , Itabira (MG), julho de 2006.....	27
Figura 10: Separação das frações do OR de copaíba.....	28
Figura 11: Protocolo experimental de indução de alergia.....	31
Figura 12: Perfil cromatográfico sesquiterpênico da <i>C. guyanensis</i>	43
Figura 13: Perfil cromatográfico diterpênico da <i>C. guyanensis</i> (metilado - zoom).....	43
Figura 14: Perfil cromatográfico sesquiterpênico da <i>C. langsdorffii</i>	46
Figura 15: Perfil cromatográfico diterpênico da <i>C. langsdorffii</i> (metilado - zoom).....	46
Figura 16: Avaliação do consumo diário da ração de caseína, protocolo 1.....	50
Figura 17: Avaliação do consumo diário da SCO na semana do desafio oral, protocolo 1.....	51
Figura 18: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com SCO, protocolo 1.....	52
Figura 19: Avaliação edema intestinal, protocolo 1.....	53
Figura 20: Infiltrado de mastócitos na submucosa intestinal, protocolo 1.....	54
Figura 21: Quantificação da peroxidase eosinofílica no jejuno distal, protocolo 1.....	55
Figura 22: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, protocolo 1.....	56
Figura 23: Avaliação da atividade de neutrófilos por quantificação da mieloperoxidase (MPO), protocolo 1.....	57
Figura 24: Avaliação da peroxidação lipídica intestinal por quantificação de Malondialdeído (MDA), protocolo 1.....	58

Figura 25: Avaliação morfológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS, protocolo 1.....	59
Figura 26: Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c tratados com <i>C. guyanensis</i> , evidenciado pela coloração de PAS, protocolo 1.....	60
Figura 27: Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c tratados com <i>C. langsdorffii</i> , evidenciado pela coloração de PAS, protocolo 1.....	62
Figura 28: Avaliação do muco ácido produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de AB pH 1,0, protocolo 1.....	64
Figura 29: Avaliação do peso corpóreo, protocolo 1.....	66
Figura 30: Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de gordura periuterina, protocolo 1.....	67
Figura 31: Avaliação do consumo diário da ração de caseína, protocolo 2.....	69
Figura 32: Avaliação do consumo diário da ração de OVA, protocolo 2.....	70
Figura 33: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com SCO, protocolo 2.....	72
Figura 34: Avaliação edema intestinal, protocolo 2.....	73
Figura 35: Infiltrado de mastócitos na submucosa intestinal, protocolo 2.....	74
Figura 36: Avaliação da atividade de neutrófilos por quantificação da mieloperoxidase (MPO), protocolo 2.....	75
Figura 37: Avaliação da peroxidação lipídica intestinal por quantificação de Malondialdeído (MDA), protocolo 2.....	76
Figura 38: Avaliação do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS, protocolo 2.....	77
Figura 39: Avaliação do peso corpóreo, protocolo 2.....	78
Figura 40: Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de gordura periuterina, protocolo 2.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da ração de caseína / ovalbumina.....	30
Tabela 2: Protocolo de tratamento 1.....	33
Tabela 3: Protocolo de tratamento 2.....	34
Tabela 4: Composição sesquiterpênica das OR e CV, <i>C. guyanensis</i>	44
Tabela 5: Composição diterpênica do OR e da RE, <i>C. guyanensis</i>	45
Tabela 6: Composição sesquiterpênica das OR e CV, <i>C. langsdorffii</i>	47
Tabela 7: Composição diterpênica do OR e da RE, <i>C. langsdorffii</i>	48
Tabela 8: Consumo da ração de caseína durante o período de tratamento.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AB – *Alcian Blue*

Al (OH)₃ - Hidróxido de alumínio

ANI 93G – *American Institute Nutrition* (ração balanceada)

APC – célula apresentadora de antígeno

BF₃ – Trifluoreto de Boro

BHCB – Herbário do Departamento de Botânica da UFMG

BHT – *Butylated hydroxytoluene* (conservante)

CCL – quimiocinas com duas cisteínas contíguas

CCR3 – receptor para eotaxina

CG – *C. guyanensis* Desf.

CG 200 – *C. guyanensis*, dose de 200mg/kg/dia

CG 400 – *C. guyanensis*, dose de 400mg/kg/dia

CL – *C. langsdorffii* Desf.

CL 200 – *C. langsdorffii*, dose de 200mg/kg/dia

CL 400 – *C. langsdorffii*, dose de 400mg/kg/dia

COX – cicloxigenase

CV - Compostos voláteis, óleos essenciais ou sesquiterpenos

CVG - Compostos voláteis, óleos essenciais ou sesquiterpenos da *C. guyanensis*

CVL - Compostos voláteis, óleos essenciais ou sesquiterpenos da *C. langsdorffii*

CXCL - quimiocina com duas cisteínas separadas por um aminoácido qualquer

DATAPLAMT – Banco de dados de amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas

DNA – ácido desoxirribonucléico

DX – Dexametasona

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPM – Erro padrão da média

EPO - Peroxidase eosinofílica

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*

GALT - Tecido linfóide associado ao intestino

GATA-1 – *Goblin transcription factor 1*, Fator de transcrição nuclear

GM-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

G-px – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HE - Hematoxilina-eosina

ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule*

IFN- γ – Interferon- γ

Ig – Imunoglobulina

IKK – proteína quinase inibitória

IL – interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LSP - Lipopolissacarídeo

MALT - Tecido linfóide associado às mucosas

MDA - Malondialdeído

MHC-II – complexo de histocompatibilidade principal tipo II

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF- κ B – Fator nuclear B

NO – Óxido nítrico

OD – densidade óptica

OMS – Organização mundial de Saúde

OPD - Ortofenileno-diamino

OR - Óleo-resina de copaíba

OVA - Ovalbumina

PAF – fator ativador de plaquetas

PAS - *Periodic acid Schiff*

PBS - Salina tamponada com fosfato

PG - Prostaglandina

PMN - Polimorfonucleares

RE - Resina ou diterpenos

REG - Resina ou diterpenos da *C. guyanensis*

REL - Resina ou diterpenos da *C. langsdorffii*

RL – radical livre

RPM – rotações por minuto

RR – Estado de Roraima

SCO - Solução de clara de ovo a 20%

SOD – Superóxido dismutase

ST – Sem tratamento

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS - *Thiobarbituric acid reagents substances*

TGI – Trato gastrointestinal

Th – Linfócito T helper

TLR-4 – receptor semelhante ao Toll, reconhece LPS (bactérias)

TMTP – 1,1,3,3-Tetrametoxipropano

TNF- – Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule*

D'AURIOL-SOUZA, Mirna Maciel. **Avaliação do efeito de duas espécies de Copaíba em modelo experimental murino de alergia alimentar.** 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RESUMO

O bálsamo de Copaíba é um óleo-resina (OR) obtido de árvores do gênero *Copaifera* L. (Caesalpineaceae), espécies nativas da América Latina e da África Ocidental. No presente estudo, foi investigada a capacidade do OR obtido de *C. guyanensis* Desf., nativo da região Amazônica e *C. langsdorffii* Desf., nativo do cerrado, no tratamento da alergia alimentar, bem como de suas frações sesquiterpênicas (óleos voláteis – CV) e diterpênicas (resina – RE). Os efeitos antialérgicos foram avaliados *in vivo*, em modelo de alergia alimentar murino induzido experimentalmente por Ovalbumina (OVA). Foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de IgE sérica, edema intestinal, hiperplasia de mastócitos, infiltrado de eosinófilos, ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica intestinal, produção de muco por células caliciformes e perda de peso corporal. Teores mais elevados de sesquiterpenos foram evidenciados na *C. guyanensis*, enquanto *C. langsdorffii* apresentou mais diterpenos em sua composição. Ambas as espécies apresentaram os sesquiterpenos -cariofileno e germanacreno D, enquanto o diterpeno ácido caurenóico foi mais predominante em *C. langsdorffii*. O OR da *C. guyanensis* foi ativa na dose de 400 mg/kg/dia, mas não demonstrou efeito antialérgico na dose de 200 mg/kg/dia. Já o OR de *C. langsdorffii* foi ativa na dose de 200 mg/kg/dia, mas apresentou-se tóxica na concentração de 400 mg/kg/dia. As frações CV de ambas as espécies apresentaram atividade sobre a hiperplasia dos mastócitos, e as frações RE sobre a atividade de neutrófilos. Os resultados indicam que os OR de *C. guyanensis* e *C. langsdorffii* são capazes de reduzir a inflamação decorrente da sensibilização por ovalbumina. Estes podem, portanto, representar uma nova opção nutracêutica e/ou terapêutica para o tratamento da alergia alimentar.

Palavras-chave: Copaíba, *Copaifera guyanensis* Desf., *Copaifera langsdorffii* Desf., alergia alimentar, ovalbumina, anti-inflamatório.

D'AURIOL-SOUZA, Mirna Maciel. **Evaluation of the effect of two species of Copaiba in experimental murine model of food allergy.** 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ABSTRACT

The Copaiba balsam is an oil-resin (OR) obtained from trees of species of *Copaifera* L. (Caesalpineaceae), native from Latin America and Africa. In the present study, we have investigated the capacity of OR from *C. guyanensis*, native from Amazon region and *C. langsdorffii*, native of cerrado in the treatment of the food allergy, as well as sesquiterpene and diterpene (volatile oils – CV; resin - RE). The anti-inflammatory effects were evaluated in vivo in a murine model ovalbumin-induced food allergy. The following parameters have been evaluated: serum IgE, intestinal edema, mast cells hyperplasia, eosinophil infiltration, neutrophil activation, lipid peroxidation, intestinal mucus production by goblet cells and loss of body weight. Chromatographic analysis evidenced higher contents of sesquiterpene in *C. guyanensis*, while *C. langsdorffii* presented more diterpene. Both the species had β -cariofileno and germanacreno D, but kaurenoic acid was more predominant in *C. langsdorffii*. The *C. guyanensis* OR was active in the dose of 400mg/kg/day, but was inactive with 200mg/kg/day. OR of *C. langsdorffii* was active in the dose of 200mg/kg/day, but it was toxic in the 400mg/kg/day concentration. Fractions CV of both the species showed activity on the hyperplasia of mast cells, and the fractions RE on the activity of neutrophils. The results indicate that OR of *C. guyanensis* and *C. langsdorffii* inhibited the inflammation caused by sensitization with ovalbumin and have potential as new nutraceutical or pharmaceutical products to treat food allergy.

Key-word: Copaiba, *Copaifera guyanensis* Desf., *Copaifera langsdorffii* Desf., food allergy, ovalbumina, anti-inflammatory.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Trato Gastrointestinal (TGI)

Considera-se, muitas vezes, que a maior área de superfície exposta do organismo seja a pele, mas, em humanos, a área de mucosa do intestino delgado é bem maior, pois, sozinha, tem, aproximadamente, de 300 a 400m² devido a milhões de microvilosidades. Estas absorvem diária e aproximadamente 130 a 190 g de proteínas da dieta (MENEZES et al., 2003; MACDONALD & MONTELEONE, 2005; WHITE et al., 2007).

O trato gastrointestinal (TGI) é o local onde acontece a absorção de nutrientes da dieta e, ao mesmo tempo, é o responsável pela defesa do organismo (SAMPSON, 2003; MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Ele é o maior sistema imunológico no corpo, confrontando-se com grande carga antigênica na forma de moléculas da dieta, organismos comensais e patogênicos (LENNERNÄS, 1998; MAYER, 2003; SAMPSON, 2005; WHITE et al., 2007). Por isso a mucosa intestinal possui estruturas linfóides que, em conjunto, formam os tecidos linfóides associados ao intestino, a GALT (Gut associated lymphoid tissue), que é parte dos tecidos linfóides associados à mucosa, a MALT (Mucosal associated lymphoid tissue). Responsável pela homeostase ao longo da extensa superfície epitelial, o intestino tem essa extraordinária habilidade de distinguir nutrientes e ainda patógenos de organismos comensais. (KIYONO & FUKUYAMA, 2004; SAMPSON, 2005).

A GALT é formada por ambos os sistemas imunes: o inato (que envolve leucócitos granulócitos e macrófagos) e o adaptativo (que envolve linfócitos). Ela promove uma resposta adaptativa extremamente pro-eficiente ao inibir respostas a antígenos “não-perigosos” e ainda monta uma resposta rápida a patógenos (SAMPSON, 2003; JANEWAY, 2007; TAKAYAMA et al., 2007).

As placas de Peyer, um dos componentes da GALT, são tecidos linfóides organizados no epitélio intestinal, formando estruturas em forma de cúpula que se estendem até o lúmen do intestino. Elas consistem em folículos centrais de linfócitos B cercados por zonas menores de linfócitos T. As placas de Peyer servem de sítio para a indução da resposta imune antígeno-específico contra antígenos introduzidos oralmente. Estes antígenos são capturados por células M (células epiteliais especializadas e adaptadas) que interagem diretamente com moléculas e partículas do lúmen intestinal, realizando endocitose deste material para o interior da célula. A membrana basal da célula M forma numerosas invaginações ao redor de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC), sendo estas últimas responsáveis pela captação e processamento do material transportado para a apresentação do antígeno e ativação dos linfócitos (JANEWAY, 2007; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A variedade de reações imunes que pode ocorrer, seguida à absorção do antígeno pelo epitélio, depende das propriedades do antígeno, assim como a frequência da exposição, da via de entrada no organismo e da história imunológica do indivíduo (SICHERER & SAMPSON, 2009). Nas mucosas, antígenos solúveis, como antígenos da dieta, são tipicamente pouco imunogênicos e induzem um estado de não-resposta conhecido como tolerância oral. Esta não-resposta das células T às proteínas ingeridas na dieta é resultado da inatividade da célula T ou da indução de células T reguladoras. A produção de interleucina (IL) anti-inflamatória IL-10 nas placas de Peyer tem papel importante na tolerância, assim como a microbiota intestinal (SAMPSON, 2003; MACDONALD & MONTELEONE, 2005).

Assim, pode-se dizer que a tolerância induzida por organismos comensais e proteínas da dieta representa o maior evento imunológico no intestino, em condições fisiológicas. A “tolerância oral” pode ser definida, então, como a supressão específica da resposta imune celular e/ou humoral a um antígeno por administração prévia deste antígeno pela via oral. É

de enorme importância imunológica porque é um contínuo evento imunológico natural dirigido a antígenos externos (FARIA & WEINER, 2005).

A tolerância oral também depende de uma barreira intestinal intacta e imunologicamente ativa. As primeiras barreiras à entrada de antígenos alimentares na submucosa são as barreiras de natureza física. O muco presente na superfície das células epiteliais do intestino tem o papel mais importante contra antígenos em potencial. A IgA secretória (sIgA) não só previne que microorganismos fiquem aderidos na superfície da mucosa como ajuda no “clearance” dos antígenos. Este anticorpo é sintetizado em grande quantidade por linfócitos B localizados nas placas de Peyer. Além disso, proteínas da dieta já foram parcialmente digeridas por proteases e pela acidez estomacal. Ainda há a barreira promovida pelas células epiteliais e suas junções. Em adição a esta eficiente linha de barreira protetora, a imunidade inata e a adaptativa do organismo promovem uma barreira ativa contra antígenos (MAYER, 2003; SICHERER & SAMPSON, 2009; EIGENMANN, 2009).

Provavelmente, a barreira mais significativa à entrada de antígenos na mucosa é a presença de enzimas proteolíticas, desde a boca até o intestino grosso. Ao realizarem a quebra de grandes polipeptídeos em pequenos di e tripeptídeos, estas enzimas permitem que ocorra o processo de absorção dos nutrientes. Elas também convertem proteínas potencialmente imunogênicas em pequenos peptídeos não-imunogênicos (MAYER, 2003). Entretanto, as proteínas podem escapar ou resistir à digestão e passar para o lúmen intestinal em uma forma intacta (MACDONALD & MONTELEONE, 2005).

Outro componente importante no controle da entrada de antígenos pela mucosa intestinal é o muco produzido pelas células caliciformes. Este muco forma uma camada espessa, onde as partículas antigênicas são aprisionadas e expelidas pelo movimento

peristáltico do intestino. Além desta função de barreira física, o muco serve de reservatório para a sIgA (MAYER, 2003).

A IgA é um anticorpo que atravessa o epitélio intestinal e é secretada no lúmen. Esta imunoglobulina pode aglutinar antígenos e aprisioná-los no muco, facilitando a remoção destas moléculas do organismo (MAYER, 2003).

A última barreira física à absorção antigênica é conferida pela célula epitelial. As junções presentes na membrana apical e basal destas células e nos espaços paracelulares são geralmente impermeáveis a grandes macromoléculas, prevenindo eventualmente a passagem de di e tripeptídeos, permitindo apenas a passagem de íons. Eventos inflamatórios e também em neonatos as junções podem se tornar menos oclusivas, permitindo a passagem de macromoléculas para a lâmina própria (MAYER, 2003).

As APC's (células apresentadoras de antígeno profissionais), principalmente células dendríticas, processam os antígenos da dieta e apresentam a um receptor MHC-II (major histocompatibility complex type II) na superfície de células T, o que resultará na tolerância oral, em condições fisiológicas ou sensibilização ao antígeno, em indivíduos predispostos (SAMPSON, 1999; EIGENMANN, 2009).

Em recém nascidos, onde o sistema imune é imaturo até 4 anos de idade e em indivíduos atópicos, geneticamente susceptíveis, pode ocorrer à passagem de proteínas não digeridas pela mucosa intestinal, causando o desencadeamento de uma resposta imune aos componentes da dieta. O rompimento deste fino balanço altera o estado normal da tolerância oral para os alimentos (MAYER, 2003; SICHERER & SAMPSON, 2009, EIGENMANN, 2009). Esta penetração de macromoléculas da dieta no organismo, através da mucosa intestinal, pode acarretar sérias conseqüências imunológicas, sendo, uma delas, a alergia alimentar (SALDANHA et al., 2004).

1.2 Alergia Alimentar

A alergia alimentar afeta cerca de 6 a 8% das crianças em fase de crescimento (até 3 anos de idade) e 2 a 3% da população em geral. A imaturidade de vários componentes da barreira no intestino, além da redução a eficiência do sistema imune nas crianças, fazem aumentar a probabilidade delas desenvolverem infecções gastrintestinais e alergia alimentar durante os primeiros anos de vida. Hipocrates, conhecido como o pai da medicina, foi o primeiro a descrever reações adversas a alimentos cerca de 2000 anos atrás, mas a comunidade médica era muito reticente para compreender ou investigar essas desordens, até recentemente (SAMPSON, 1999).

Alérgenos são proteínas de tamanho entre 10 e 70 kDa. Em geral, eles são glicoproteínas hidrossolúveis, com estabilidade térmica e ácida e com resistência à proteólise. Os alérgenos possuem também a habilidade de se ligar a íons metálicos, lipídeos ou a esteróides (SAMPSON 1999 e 2003; BREITENEDER & MILLS, 2005; SICHERER & SAMPSON, 2009).

Apesar da enorme diversidade de exposição a antígenos da dieta, somente poucos alimentos são responsáveis por alergias alimentares. Os principais são: leite, ovos, amendoim e peixes (SAMPSON, 2003; SICHERER & SAMPSON, 2009; GUO et al., 2009). Alergias a ovos e a leite de vaca são mais freqüentes em crianças, enquanto a frutos do mar e amendoim são mais comuns em adultos (SICHERER & SAMPSON, 2009).

A alergia alimentar caracteriza-se por uma série de reações (hipersensibilidade) ao alimento por um mecanismo que envolve resposta imune. De acordo com o tipo de reação

imune, o indivíduo com alergia pode apresentar características clínicas específicas, com sintomas gastrintestinais ou não, ligados ou não a produção de IgE (SAMPSON, 1999; EIGENMANN, 2009).

Alergia do tipo I, ou doenças anafiláticas, são denominadas hipersensibilidade do tipo I por terem início rápido, minutos após o estímulo ao antígeno e por estarem ligadas à produção de IgE (BRASILEIRO-FILHO, 2006; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006). As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos: a pele (urticária e angioedema), o trato respiratório (rinite e asma), TGI (enjoos, vômitos, dor abdominal e/ou diarreia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). Estas reações podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido, ou por distribuição sistêmica das proteínas após a ingestão (SAMPSON, 1999 e 2003) e consistem em duas fases: uma imediata e outra tardia (XIE & HE, 2005).

Em crianças e indivíduos predispostos, quando há diminuição das barreiras físicas e imunológicas da mucosa digestiva, a exposição inicial do antígeno às células apresentadoras de antígenos profissionais (APC's) leva principalmente à ativação de células T helper 2 (Th2) e síntese de IgE específico para o alérgeno. A apresentação destes peptídeos acontece por via de moléculas MHC classe II. Esta fase é conhecida como sensibilização alérgica. Na presença desta estimulação, as células T regulam a expressão de um conjunto de genes codificados no cromossoma, que incluem os genes que codificam interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (granulocyte / macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Essas citocinas estão envolvidas na troca de classe de imunoglobulina pelos linfócitos B para a síntese de IgE (IL-4 e IL-13), o recrutamento de mastócitos (IL-4, IL-9 e IL-13) e a maturação de eosinófilos (IL - 3, IL-5 e GM-CSF) e basófilos (IL-3 e IL-4), que são as principais células efetoras secretoras da resposta alérgica (SAMPSON, 1999; HOLGATE & POLOSA, 2008).

Linfócitos T helper-2 (Th2) produzem citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13. IL-4 produzida tem papel crucial que, sob influência do ligante CD40, muda o isotipo A (IgA) para o E (IgE) nos linfócitos B. IL-5 aumenta a produção de IgE dependente de IL-4, além de induzir proliferação e ativação de eosinófilos juntamente com a IL-3. Em contraste, células T helper-1 (Th1) secretam citocinas como IL-2 e interferon- γ (IFN- γ) que inibem a secreção de IgE e IgG1 e aumentam a secreção de IgG2a. O balanço entre as respostas Th1 e Th2 pode ser uma estratégia para prevenir doenças alérgicas mediadas por IgE (TAKANO et al., 2007; MEILER et al., 2008).

A IgE específica produzida, então, entra na circulação e se liga a receptores Fc ϵ RI (alta afinidade) em mastócitos e basófilos nos tecidos, de modo que estas células ficam sensibilizadas e preparadas para reagir ao encontro com o alérgeno, em um segundo momento (SAMPSON, 1999). Mastócitos são células que tem um papel fundamental na alergia, pois se encontram justapostos à micro-circulação. Os seus mediadores, principalmente a histamina, podem provocar elevada permeabilidade microvascular e provocar uma *up*-regulação das moléculas de adesão, necessárias para o recrutamento de leucócitos (CARA et al., 2004; GUO et al., 2009).

A exposição subsequente ao alérgeno causa o recrutamento de células inflamatórias e ativação e liberação de mediadores, que são responsáveis pelas reações alérgicas imediatas (de 1 a 30 minutos) e reações alérgicas tardias (entre 6 a 72 horas) (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Na resposta alérgica imediata, poucos minutos de contato das IgE ligadas nos receptores Fc ϵ RI em mastócitos com o alérgeno específico (*crosslinking*), faz com que estas células desgranulem, liberando tanto mediadores pré-formados quanto recém-sintetizados, que incluem histamina, leucotrienos e citocinas. Isto promovendo o aumento da

permeabilidade vascular, contração do músculo liso e secreção de muco. Mastócitos também liberam citocinas e quimiocinas, que recrutam macrófagos, eosinófilos e basófilos que compõem a resposta tardia (BINGHAM & AUSTEN, 2000; HOLGATE & POLOSA, 2008).

Mediadores autacóides, como a histamina, e leucotrienos, aumentam a expressão endotelial da P-selectina e E-selectina para iniciar o rolamento de leucócitos, seguido da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) e da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1). Esses interagem com os receptores integrina para acoplar os leucócitos e amparar na sua passagem para o espaço perivascular (AKDIS & BLASER, 2003; XIE & HE, 2005; HOLGATE & POLOSA, 2008). Quimiocinas como CC-chemokine ligand 2 (CCL2), CCL8, CCL7 e CCL13 (proteína quimiotática de monócitos 1, 2, 3 e 4), CCL3, CCL24 e CCL26 (eotaxinas 1, 2 e 3) e CCL5 (RANTES), direcionam e privilegiam leucócitos à secreção de mediadores (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Eosinófilos liberam um grande número de mediadores pró-inflamatórios, incluindo os leucotrienos e proteínas básicas (proteína catiônica, peroxidase eosinofílica, proteína básica principal e a neurotoxina derivada de eosinófilos), e eles também podem ser uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-3 (IL-3), IL-5 e IL-13 (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Já o aumento da produção de muco no TGI é um evento mediado principalmente por IL-4 e IL-13 (BLANCHARD et al., 2004; DOURADO et al., 2010).

Modelos murinos de alergia alimentar permitem estudos *in vivo* dos componentes imunológicos envolvidos nos diferentes aspectos da doença. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental de alergia alimentar em que camundongos são sensibilizados à ovalbumina (OVA). Este modelo simula vários sinais encontrados na alergia alimentar humana, tais como perda de peso corporal, aumento de anticorpos IgE anti-OVA,

edema intestinal e aumento da hiperplasia de mastócitos na submucosa do jejunum (SALDANHA et al., 2004).

A primeira reação anafilática à ovalbumina (OVA) foi relatada por Marcello Donati no século dezesseis (SAMPSON, 1999). A OVA, proteína de 45,9 kDa, é o principal componente do claro do ovo (54%) (TAKAGI et al., 2003; MINE & YANG, 2008). Ela é uma fosfoglicoproteína, ou seja, contém fosfato e carboidrato em sua molécula (NISBET et al., 1981; MINE & YANG, 2008). Apenas a isoforma I-OVA, que aparece durante o armazenamento do ovo, é inibidora enzimática reversível da tripsina (CUCCIOLONI et al., 2004; MELLET et al., 1996), sendo capaz ainda de ligar-se a íons como o ferro, o manganês, o zinco, o cobre e outros metais (SILVA et al., 2002).

É crescente a incidência do número de casos de alergia alimentar no mundo hoje. Um número crescente de crianças está também apresentando alergias alimentares que persistem até a idade escolar. Este quadro revela uma necessidade urgente de se desenvolver novas estratégias para o tratamento desta patologia (SKRIPAK & SAMPSON, 2008).

Alguns estudos já vêm sendo conduzidos, por exemplo, a partir da imunoterapia sublingual / oral, reações à exposição à proteína desnaturada pelo calor, engenharia de alimentos utilizando proteínas recombinantes, imunoterapia não específica contra o antígeno, e imunoterapia anti-IgE (SKRIPAK & SAMPSON, 2008; SICHERER & SAMPSON, 2008). Outros tratamentos são desejáveis e o desenvolvimento de protocolos envolvendo produtos naturais é incentivado inclusive pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (WHO, 2003). Na China e outros países do oriente, diversos estudos já vem sendo conduzidos visando verificar o potencial das plantas usadas na medicina tradicional daqueles países. A alergia é considerada a segunda condição na qual a população mundial dá preferência a medicinas complementares (BIELORY, 2004).

1.3 Biodiversidade e plantas medicinais brasileiras

Estima-se que das 250 mil espécies de plantas no mundo, apenas 10% tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas possibilidades no desenvolvimento de novos produtos (NOGUEIRA et al., 2010). A flora americana representa uma das mais ricas fontes de produtos com potencial biotecnológico devido à sua vasta diversidade e a rica tradição de usos das plantas. Registros históricos demonstram, por exemplo, que os Ameríndios já usavam várias espécies vegetais há centenas de anos atrás, como abacate (*Persea americana* Mill.), batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), mate (*Ilex paraguayensis* A. St. Hil.) e cacau (*Theobroma cacao* L.) (WOLTERS, 1992).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas (SIMÕES ET AL, 2007). Isto faz com que exista aqui um enorme potencial para a descoberta e desenvolvimento de novos produtos de origem vegetal, como os fitoterápicos, fitofármacos e os nutracêuticos. Fitoterápicos são produtos farmacêuticos preparados com extratos vegetais, fitofármacos são princípios ativos isolados das plantas e os nutracêuticos ou alimentos funcionais são os que exercem funções protetoras, sobretudo antioxidantes, mas que não são nutrientes funcionais, como as vitaminas e minerais.

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novos produtos farmacêuticos ou nutracêuticos. A seleção das plantas é um ponto fundamental para o sucesso da pesquisa e ela pode ser feita por meio de quatro abordagens principais: randômica, quimiotaxonômica, etológica e etnodirigida. As investigações randômicas compreendem a coleta ao acaso de plantas para triagens fitoquímicas e farmacológicas. A abordagem quimiotaxonômica ou filogenética consiste na seleção de espécies de uma família ou gênero, para as quais se tenha algum conhecimento fitoquímico de ao menos uma espécie do grupo. Um caminho

recentemente apontado para a descoberta de novos fármacos é baseado nos estudos de comportamento animal, como primatas, ou abordagem etológica. Finalmente, a abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de uso por grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso. Enfatiza-se a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e a aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença. Este é um dos caminhos mais utilizados atualmente por duas razões básicas: o tempo e o baixo custo envolvidos na coleta dessas informações (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). Após a seleção e coleta das plantas a serem estudadas, procede-se às pesquisas fitoquímicas em que são feitas as extrações, isolamento, purificação e caracterização dos componentes químicos das plantas. A farmacologia e toxicologia avaliam o potencial desses produtos nos sistemas biológicos.

As atividades biológicas das plantas são desencadeadas pelos compostos do metabolismo secundário. O metabolismo é dividido em primário ou de macromoléculas e secundário ou de micromoléculas. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, com funções vitais bem definidas, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Este é o caso dos aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e da clorofila. Os produtos do metabolismo secundário são produzidos a partir do primário, através de rotas biossintéticas diversas. Eles geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas. Diferentes dos metabólitos primários, os metabólitos secundários são encontrados em concentrações relativamente baixas e somente em determinados grupos de plantas. Embora o metabolismo secundário não seja sempre necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, acredita-se que ele desempenha um papel importante da interação das plantas com o meio ambiente. Estes produtos atuam

primeiramente na defesa do vegetal, agindo como dissuasórios alimentares, como, por exemplo, os taninos em frutos verdes e as toxinas, como os alcalóides (SIMÕES et al., 2007, MEDEIROS & VIEIRA, 2008).

O caráter “natural” dos metabólitos secundários não é garantia da isenção de reações adversas e outros problemas decorrentes de seu uso (LANINI ET AL, 2009). Por isso, desde a década de 70, a OMS (Organização Mundial da Saúde) vem estimulando o desenvolvimento de pesquisas de validação de plantas medicinais, como forma de se promover o seu uso seguro e eficaz. Validar uma planta significa verificar a sua eficácia e a segurança do seu uso. Apesar de todos esses esforços, no Brasil, as plantas medicinais, especialmente as espécies da flora nativa permanecem sendo consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, que são propagadas por usuários ou comerciantes. Os estudos de validação são importantes e necessários, também quando se considera que o crescimento do mercado brasileiro de medicamento fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano (SIMÕES et al., 2007; WHO, 2002).

1.4 Bálsamo de Copaíba

Entre as plantas medicinais que contam com vasto histórico de uso na medicina tradicional estão as copaibeiras, árvores que atingem entre 25 e 40 metros de altura e são comuns à América Latina e África Ocidental. No Brasil, elas ocorrem nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. Elas são árvores de crescimento lento e chegam a viver até 400 anos. Possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem. As sementes são pretas e ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos (ALENCAR, 1982; VAN DEN BERG, 1993; LORENZI, 1992; XENA & BERRY, 1998). As copaibeiras

pertencem à família *Caesalpineaceae* (antes Leguminosae) (LLOYD, 1898) e possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil (INDEX KEWENSIS, 1996). Entre as espécies mais abundantes no país estão a *Copaifera officinalis* L., *C. guyanensis* Desf., *C. reticulata* Ducke e *C. multijuga* Hayne (todas na Amazônia), *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. coriacea* (nordeste) e *C. langsdorffii* (nordeste e sudeste) (WOOD et al., 1940; RIZZINI & MORS, 1966).

A origem do nome copaíba é do tupi “cupa-yba”, que significa árvore depósito ou que tem jazida, em alusão ao bálsamo produzido em seu interior que é o produto da planta utilizado na medicina tradicional. (RODRIGUES, 1905). No Brasil, as árvores são conhecidas também como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copai, copaibarana, copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas, e o óleo é chamado de óleo de copaíba ou bálsamo (www.dataplant.org.br). Nos demais países da América Latina, denomina-se a árvore como “palo-de-bálsamo”, “aceite”, “cabima”, entre outros. A denominação do bálsamo em inglês é “copaíba balsam” e do óleo volátil, “copaíba oil”. Em francês a árvore é denominada “copayer”, a oleoresina, “baume de copayer” e o volátil, “huile de copayer” (PIERI et al., 2009).

O bálsamo é, na realidade, um óleo-resina (OR), constituído de uma fração com compostos voláteis ou sesquiterpênica (CV) e uma fração resinosa ou diterpênica (RE). Ele é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Estes canais são formados por dilatações dos espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam no meristema, chamados de canais esquizógenos, mais salientes no tronco (lenho) da árvore. A exsudação do óleo-resina nas árvores de Copaíba em condições patológicas é produto de desintoxicação do organismo vegetal e funciona como uma defesa da planta contra animais, fungos e bactérias. Ele é extraído um líquido transparente, de cor que varia de amarelo ouro a marrom, dependendo da espécie (Figura 1). Somente a *C. langsdorffii* apresenta um óleo-

resina vermelho, recebendo, então, a denominação popular de copaíba-vermelha (PIERI et al., 2009).



Figura 1: Tipos de colorações mais comuns para o óleo-resina de copaíba. Foto retirada da cartilha Copáiba: ecologia e produção do óleo-resina, EMBRAPA, 2004.

O óleo-resina pode ser obtido, através da perfuração no tronco da árvore, tendo sido utilizadas desde os primórdios da exploração do produto, inúmeras formas de extração que provocam sérios danos às árvores ou até sua morte (PIERI et al., 2009). A única prática de coleta não agressiva é aquela realizada através de uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco (Figura 2). Terminada a coleta, o orifício é fechado com argila para impedir a infestação por fungos ou cupins. Assim, esta argila pode ser retirada posteriormente para realização de nova coleta (MEDEIROS & VIEIRA, 2008).



Figura 2: Método de extração do óleo-resina de copaíba, com um trado (técnica não agressiva). (A) Perfuração do tronco. (B) Óleo-resina escorrendo. (C) Coleta. (D) Cessação da extração. (E) Fechamento do orifício. Foto retirada do trabalho de Medeiros e Vieira, 2008.

Registros históricos descrevem que o OR da copaíba já era usado pelos Ameríndios desde a chegada dos primeiros europeus ao continente. A primeira referência sobre o gênero *Copaifera* foi descrito em 1534, em um relatório encaminhado na época para o Papa Leo X (DWYER, 1951). No Brasil, uma das primeiras descrições sobre ao uso da planta foi feita por Gabriel Soares de Souza em seu Tratado Descritivo do Brasil, publicado em Portugal em 1587 (SOUZA, 1587):

“Embaíba é uma árvore comprida e delgada, que faz uma copa em cima de pouca rama; a folha é como de figueira, mas tão áspera que os índios cepilham com ellas os seus arcos e hastes de dardos, com a qual se põe a madeira melhor que com pelle de lixa... Tem o olho d’ esta árvore grandes virtudes para com ele curarem feridas, o qual depois de pisado se põe sobre feridas mortaes, e se curam com elle com muita brevidade, sem outros ungientos; e o entrecasco d’ este olho tem ainda mais virtude, com o que também se curam feridas e chagas velhas, e taes curas se fazem com o olho d’ esta árvore, e com o óleo de copaiba, que se não ocupam na Bahia cirurgiões, porque cada um o é em sua casa.”

Acredita-se que a descoberta das propriedades cicatrizantes da copaíba, bastante difundidas entre os Ameríndios, tenha acontecido a partir da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaíbas para cicatrizarem suas feridas (PIERI et al., 2009). Os indígenas feridos acreditavam também que, untando o corpo com o óleo de copaíba e deitando sobre um braseiro a mais de um metro de altura, se livrariam de males maiores (CRUZ, 1965).

O uso do OR da copaíba foi também registrado por diversos naturalistas europeus que viveram ou viajaram pelo Brasil nos séculos passados, entre os mais importantes Guilherme Piso, médico holandês nomeado pela Companhia das Índias Ocidentais para servir no Brasil na expedição de Maurício de Nassau. Piso viveu por oito anos no noroeste do país, durante o século 17 e, em seu livro, *Historiae Naturalis & Medicae* (figura 3), publicado em 1648 na Holanda, ele descreveu o uso do OR da copaíba para tratar feridas ocasionadas por “flechadas” (PISONIS, 1648). Em 1762, Carl Von Linneu descreveu botanicamente a *Copaifera officinallis*, assumindo, assim, a descrição oficial do gênero *Copaifera* L. (DWYER, 1951).

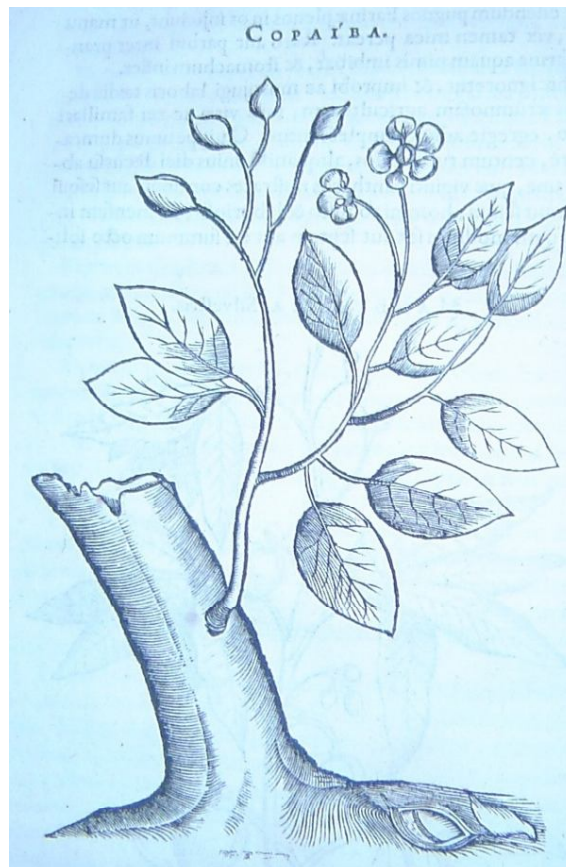


Figura 3: Foto ilustrativa do livro *Historiae Naturalis & Medicae*, publicado em 1648 na Holanda por Piso.

Outros naturalistas também descreveram o uso de plantas medicinais pela população brasileira século 19, e entre as plantas mais citadas encontra-se a copaíba. Naquela época, ela era usada contra gonorréia, leucorrea, psoríases, e cicatrizante de feridas (BRANDÃO et al., 2008).

Atualmente, o uso do OR é muito difundido, especialmente entre a população da região amazônica, onde é empregado na medicina popular como cicatrizante e anti-inflamatório das vias respiratórias e urinárias (VIEIRA, 1992; VAN DEN BERG, 1993; MARTINS et al., 1995; CORRÊA et al., 2000; CAMPOS, 2000). Outras utilizações populares são como antileucorréico, antiblenorrágico, antirreumático, hipotensor, anticancerígeno, para tratar psoríase e ulcerações (VAN DEN BERG, 1993; MATOS, 1997). O OR é usado também contra o bacilo de tétano e para combater a herpes (VIEIRA, 1992); como bactericida e antissifilítico (CORRÊA et al., 2000; CAMPOS, 2000); tratar cistite e diarreia (MARTINS et al., 1995; CAMPOS, 2000) e contra disenterias, inflamações de garganta e dos rins, sinusite (MARTINS et al., 1995).

As espécies com as propriedades medicinais mais apreciadas pela população são: *Copaifera officinalis* (L.) Kuntze, *C. coriacea* (Mart.) Kuntze, *C. langsdorffii* (Desf.) Kuntze, *C. reticulata* Ducke (RIZZINI & MORS, 1921; PENNA, 1941; BRAGA, 1960; CRUZ, 1965; VIEIRA, 1992; VAN DEN BERG, 1993; MARTINS, 1995; MATOS, 1997; CAMPOS, 2000; CORRÊA, 2000). Segunda a literatura, os melhores bálsamos de copaíba, com verdadeiras qualidades terapêuticas são fornecidos pela *C. reticulata* Ducke e *C. guyanensis* Desf. (PENNA, 1941; LE COINTE, 1947; CRUZ, 1965; VAN DEN BERG, 1993). E como todo produto natural, o OR não está isento de efeitos colaterais na superdosagem: náuseas, vômitos e diarreias (MARTINS et al., 1995; CORRÊA et al., 2000).

O OR da copaíba é também encontrado facilmente no comércio, como encapsulados ou envasados em pequenos frascos (Figura 4). Infelizmente, como a maior parte dos produtos vegetais comercializados no Brasil, essas preparações também carecem de qualidade, estando freqüentemente adulterados com outros óleos vegetais, o que compromete a sua eficácia (VEIGA JR et al., 2001). De fato, a falta de qualidade dos produtos vegetais comercializados no país levou o Ministério da Saúde a implementar, desde 1995, uma série de medidas visando aprimorar o setor farmacêutico dos fitoterápicos. Desde então, para se obter registro junto aos órgãos governamentais (ANVISA), é necessário que o produto tenha eficácia, segurança e qualidade, como exigido para qualquer produto sintético (BRASIL, 1995; BRASIL, 2004; BRASIL 2008). O OR de copaíba, por exemplo, já foi até formalizado na medicina convencional por sua inclusão na 1ª e 2ª edição da Farmacopéia Brasileira, publicada em 1929 e 1959, respectivamente (BRANDÃO et al., 2006), mas a sua monografia foi excluída das edições mais recentes, em consequência da falta de estudos farmacológicos sobre a eficácia e toxicidade dessas espécies.



Figura 4: Produtos comercializados com OR de copaíba.

O OR da copaíba é também um dos mais importantes produtos florestais não madeireiros (PFNM) produzidos na Amazônia hoje, sendo exportado para Estados Unidos,

França, Alemanha e Inglaterra. O OR também é usada para outros fins em algumas regiões do norte do Brasil, entre eles como combustível na iluminação pública, fixador de perfumes, combinando suas notas frescas e acres com outras essências portadoras de notas florais. É ainda aproveitado como secativo na indústria de vernizes, solventes em pinturas de porcelanas, aditivos em alimentos com aprovação do FDA (*Food and Drugs Administration*), na indústria de cosméticos por suas propriedades emolientes, bactericidas e anti-inflamatórias para a fabricação de cremes, sabonetes, xampus e condicionadores (PIERI et al., 2009). Há também grande interesse na madeira de algumas espécies pela sua superfície lisa, lustrosa, durável, de alta resistência ao ataque de insetos e baixa permeabilidade, que são características desejáveis para o uso na fabricação de peças torneadas e para a marcenaria em geral (CARVALHO, 1942). A árvore também tem sido utilizada para a fabricação de carvão (LOUREIRO, 1979) e pelas indústrias de construção civil e naval (CARVALHO, 1994).

Vários estudos vêm sendo conduzidos hoje visando verificar a eficácia farmacológica do OR de copaíba, especialmente aquelas ações preconizadas na medicina tradicional. As ações que vem sendo mais investigadas são: como anti-inflamatória, gastroprotetor, cicatrizante de feridas, analgésica (PAIVA et al., 1998, 2002 e 2004; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2005; BRITO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; VEIGA-JÚNIOR et al., 2006 e 2007, VIEIRA et al., 2008), atividade antinociceptiva (GOMES et al., 2007), atividade antineoplásica (LIMA et al., 2003; GOMES et al., 2008), repelente de insetos (DE FERNANDES & FREITAS, 2007) e antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 2006). Ainda foram estudadas as ações vasorelaxante, citotóxica e embriotóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2002) e como substituto do eugenol na odontologia (RIBEIRO, 1989).

A composição química do OR já foi definida em vários estudos fitoquímicos estudos, sendo constituído por uma mistura dos metabólitos secundários: sesquiterpenos e diterpenos (CASCON & GILBERT, 2000). A caracterização química do OR é muito importante, pois

sua composição de sesquiterpenos e diterpenos pode variar enormemente entre as espécies, entre árvores de uma mesma espécie e sazonalmente numa mesma planta. A figura 5 ilustra um cromatograma típico do OR, obtido por cromatografia gasosa de alta resolução. Nele pode-se notar que sesquiterpenos (eluídos entre 8 e 13 minutos) e diterpenos (eluídos entre 20 e 26 minutos) são observados em duas regiões distintas (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

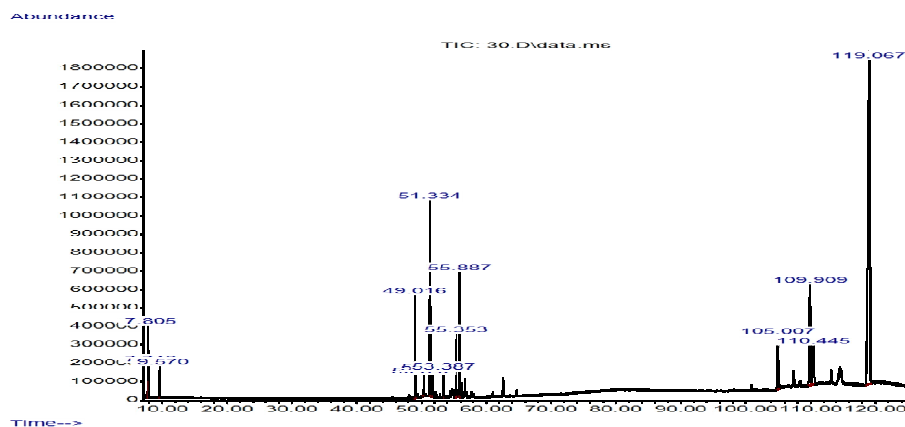


Figura 5: Cromatograma típico de óleos de Copaíba, onde os primeiros picos são de sesquiterpenos e os seguintes formados por diterpenos.

Cerca de 70 sesquiterpenos foram identificados nos OR de diferentes espécies, sendo uma parte formada por hidrocarbonetos e outra por moléculas oxigenadas (óxidos e alcoóis) (GOMES et al., 2008). Dos sesquiterpenos que mais ocorrem são α -humuleno, β -cariofileno, α - e β -selineno, α - e γ -cadineno (VEIGA JR. & PINTO, 2002). O sesquiterpeno β -cariofileno é muito citado na literatura por responsável pela atividade anti-inflamatória do OR de copaíba (Figura 6) (GUELARDINI et al., 2001; VEIGA-JUNIOR et al., 2001 e 2007; MAISTRO et al., 2005; CHO et al., 2007; GOMES et al., 2007 e 2008).

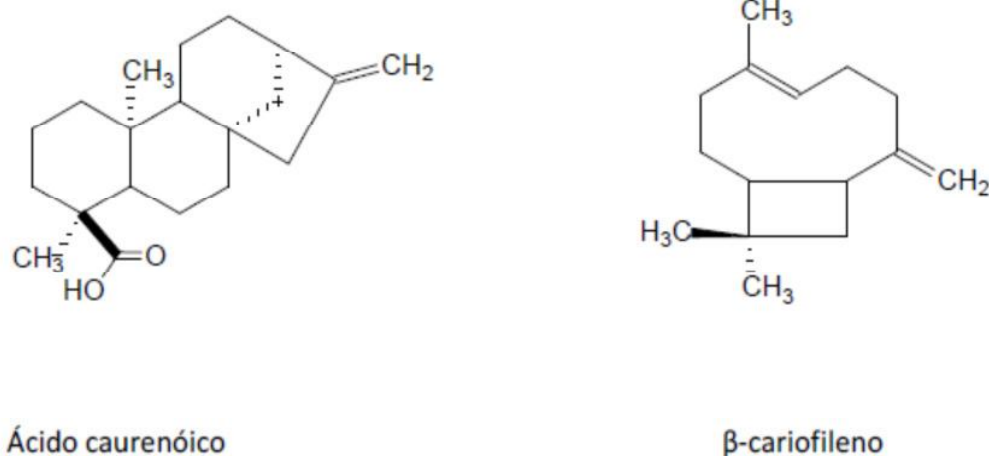


Figura 6: Estruturas químicas do diterpeno ácido caurenóico e do sesquiterpeno β-cariofileno.

Cerca de 27 diterpenos já foram identificados nos OR, sendo que todos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano (Figura 7). Dos diterpenos estudados, os mais citados são o ácido caurenóico, ácido hardwíckiico, ácido clorechínico, ácido covalênico, mas o único presente em todos os OR é o ácido copálico, podendo ser este utilizado como biomarcador da copaíba. O ácido caurenóico (Figura 6) é o diterpeno mais citado como tendo atividade anti-inflamatória (PAIVA et al., 1998, 2002 e 2004; COSTA-LOTUFO et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2006; SILVA et al., 2008; VIEIRA et al., 2008)

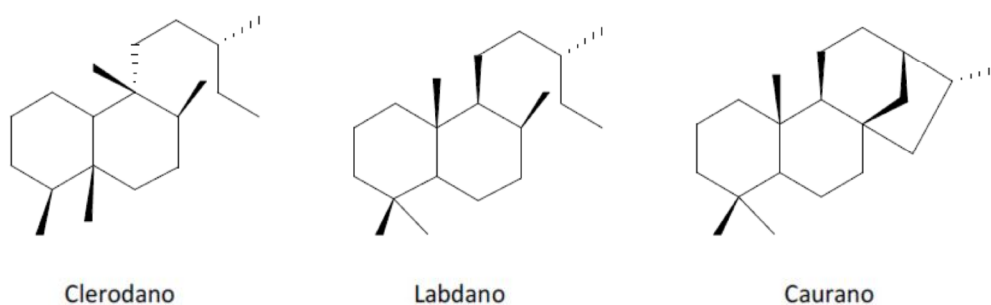


Figura 7: Os esqueletos diterpênicos: clerodano, labdano e caurano.

A frequência em que estes sesquiterpenos e diterpenos aparecem nos OR de copaíba foi estudada por Rigamonte-Azevedo e colaboradores (2004), a partir de oitos espécies: 100% continham β -cariofileno, 62,5% α -humuleno e β -bisaboleno, 50% β -elemeno, 37,5% α -bergamoteno, α -copaeno e δ -cadineno. Os ácidos copálico, hardwiickiico e covalênico apresentaram frequência de 72,5% e o ácido caurenóico 50% (as concentrações de referência foram maiores que 1% na amostra). O ácido copálico apresentou concentrações menores que 1%, mas esteve presente em todas as amostras de copaíba analisadas.

Tendo em vista da importância histórica da medicina tradicional e o potencial dos OR de copaíba para o desenvolvimento de novos produtos, nesta pesquisa foi avaliada a capacidade de duas espécies, a *Copaifera guyanensis* Desf e a *Copaifera langsdorffii* Desf, no tratamento da alergia alimentar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do óleo-resina (OR) obtidos das espécies *C. guyanensis* Desf. e *C. langsdorffii* Desf., bem como de seus compostos voláteis (CV) e de suas resinas (RE), no modelo murino de alergia alimentar induzida experimentalmente por ovalbumina (OVA).

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar se os tratamentos com os OR, CV e RE interferem nos seguintes parâmetros encontrados na mucosa intestinal de animais alérgicos:
 - Edema;
 - Hiperplasia de Mastócitos;
 - Infiltrado Inflamatório de Neutrófilos e Eosinófilos;
 - Peroxidação lipídica.
 - Produção de muco;
2. Avaliar se os tratamentos interferem na produção de IgE;
3. Avaliar se os tratamentos interferem no emagrecimento e na perda de tecido adiposo observado em animais alérgicos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenções dos OR de *C. guyanensis* e *C. langsdorffii*

O OR da *C. guyanensis* foi coletado a partir da exsudação do tronco de uma árvore localizada no município de Presidente Figueiredo (GPS 0830542/ 9773768), estado do Amazonas, em novembro de 2004. A elevada altitude das folhas (mais de 40 metros, figura 8) impossibilitou a obtenção e a preparação de exsicata no momento da coleta, para sua exata identificação taxonômica. A localização do *especimen*, as características morfológicas da árvore, bem como as características físico-químicas do OR, sugerem que a espécie se trate da *C. guyanensis*, conforme o registrado pela botânica Regina Célia Viana Martins da Silva da EMBRAPA/RR.



Figura 8: Foto da árvore da *C. guyanensis* e aspecto do OR coletado, Presidente Figueiredo (AM), novembro de 2004.

O OR da *C. langsdorffii* (figura 9) foi coletado no distrito de Santa Catarina, município de Itabira (GPS 680530/ 7854562), Minas Gerais, em julho de 2006. Amostras de

folhas e fruto foram coletadas e a identificação taxonômica foi feita pelo botânico João Renato Stehmann, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (amostra BHCB nº 31504).



Figura 9: Foto da árvore da *C. langsdorffii* e aspecto do OR coletado. Itabira (MG), julho de 2006.

O OR de *C. guyanensis* apresentou-se como um líquido fluido, amarelado, de odor agradável e aromático, característico de espécies da Amazônia. Já o OR da *C. langsdorffii* apresentou elevada viscosidade, cor marrom-avermelhado e odor penetrante, característicos desta espécie. Ambos os OR foram acondicionados em frascos de vidro e preservados em geladeira para melhor conservar seus CV.

Amostra autêntica plural de ambos os OR coletado encontra-se depositado no Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas da Universidade Federal de Minas Gerais (DATAPLANT-UFMG).

3.2. Separação das frações CV e RE

Este procedimento teve como objetivo separar os dois grupos de componentes do OR, facilitando sua caracterização e avaliação da atividade antialérgica. A separação das frações do OR foi realizada no Laboratório de Farmacognosia, FAFAR/UFMG, por meio de hidrodestilação (COSTA-LOTUFO et al., 2002), conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição (figura 10). O destilado foi recolhido em um tubo graduado (aparelho de Clevenger).

Amostras de OR de cada uma das espécies (6 g) foram colocadas em balão de fundo redondo e adicionou-se 12 mL de etanol. O balão foi levado para o aparelho de ultrassom, para auxiliar na homogeneização. Em seguida, adicionou-se 160 mL de água destilada e pérolas de porcelana à mistura OR-etanol. Para a hidrodestilação procedeu-se o aquecimento da mistura até ebulição, seguindo por mais duas horas. Coletou-se aproximadamente 1,5 mL do destilado contendo os CV. O líquido foi dessecado a partir da adição do sulfato de sódio anidro, para retirar qualquer vestígio de água presente. A resina foi obtida a partir da secagem direta do resíduo em evaporador rotatório, a uma temperatura máxima de 60°C, em ambiente a vácuo.



Figura 10: Separação das frações do OR de copaíba.

3.3. Caracterização dos componentes químicos por cromatografia gasosa

A caracterização cromatográfica foi feita no Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas/UFMG, por cromatografia gasosa de alta resolução. Foi utilizado um equipamento (Varian CP-3380) munido com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna DB-wax (J%W Scientif) 30m X 0,25mm com gradiente de temperatura: 80°C, 1min, 7°C/min até 240°C; injetor (split de 1/100) e detector a 260°C. Hidrogênio foi usado como gás de arraste (2 ml/min) e o volume de injeção foi de 1µl. Para a análise da fração diterpênica (resina), uma alíquota da amostra (15 mg) foi metilada em 100 µl de BF₃/metanol (Sigma) em tubo de microcentrífuga fechado a 80°C por 10 min em banho-maria. Adicionou-se 400µl de metanol apenas para diluição e foram injetados então 1 µl no cromatógrafo gasoso para análise.

3.4 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, jovens (idade aproximada de 6 a 8 semanas), provenientes CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral / ICB, em gaiolas de plástico, contendo, no máximo, 5 animais/gaiola. Assim que chegaram do CEBIO, os animais foram vermifugados com Ivermectina (Ivomec ® - Bayer), solução a 0,08%, por sete dias, veiculado na mamadeira de água. Após este período, as gaiolas foram transferidas para as estantes ventiladas (ALESCO).

Os procedimentos experimentais realizados nessa dissertação de mestrado foram executados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), sob o protocolo nº 199/2007.

3.5. Preparo das rações de caseína e de ovalbumina (OVA) e avaliação do peso corporal

Para impedir que o emagrecimento dos animais fosse gerado por uma dieta desbalanceada, as rações de caseína e de ovalbumina (OVA) foram preparadas no próprio laboratório, conforme tabela 1 (receita padrão para roedores ANI93G; MOREIRA,2006). As rações foram pesadas diariamente (ração consumida / não consumida), com o objetivo de avaliar consumo e possíveis ajustes de doses dos tratamentos com o OR, CV e RE das copaíbas e dexametasona (controle ativo, DX). O peso corporal dos animais foi avaliado individualmente, nos dias -1, 7, 14, 21 e 28, e o delta de peso calculado a partir da fórmula: {peso final - peso inicial (imunização primária)}. O peso final foram os dias 7, 14, 21 e 28.

Tabela 1: Composição da ração de caseína / ovalbumina (ANI93G).

Componente da ração	Quantidade (g)
Proteína (Caseína ou Ovalbumina)	200,0
Metionina	3,0
Amido de Milho	529,5
Sacarose	100,0
Celulose	50,0
Óleo de Soja	70,0
BHT	0,014
Mistura de Minerais (Rosther ®)	35,0
Mistura de Vitaminas (Rosther ®)	10,0
Bitartarato de Colina	2,5
Água	Qs
Óleo de Copaíba	De acordo com o peso dos animais
TOTAL	1.000,0

3.6 Sensibilização e desafio alérgico

Para indução da alergia (imunização primária), os camundongos foram inoculados com OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), na dose de 10µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃ - 1mg) em salina (0,2 mL), por via subcutânea no dorso (dia 0). O controle recebeu apenas adjuvante (Al(OH)₃). Os animais receberam uma segunda imunização (secundária) 14 dias depois (dia 14). Após o sétimo dia da imunização secundária, os animais receberam como única fonte alimentar, ração contendo OVA ou solução de clara de ovo (SCO) a 20%, dependendo do protocolo de tratamento (Figura 11).

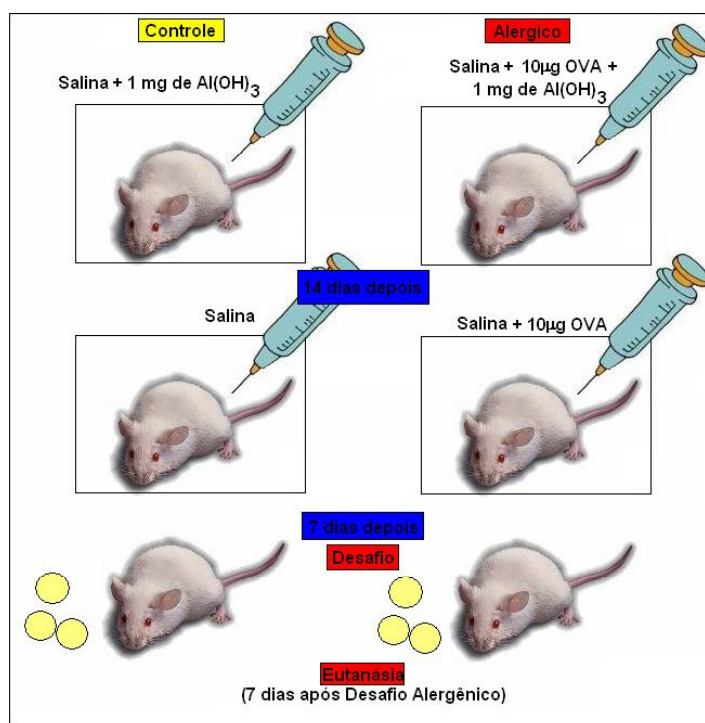


Figura 11: Protocolo experimental de indução de alergia. Camundongos BALB/c foram sensibilizados (OVA+) com 10µg OVA + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 g OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, o desafio alérgico foi realizado de duas formas distintas, dependendo do protocolo. **(1)** As mamadeiras contendo água de todos os grupos foram substituídas por SCO 20% e os tratamentos foram ministrados na ração de caseína, do dia -1 até dia 28 (eutanásia). **(2)** A ração de caseína trocada por ração de ovalbumina, os tratamentos na ração de caseína foram do dia -1 até dia 21 e posteriormente pelo método de gavagem até dia 28 (eutanásia).

3.7 Esquemas de tratamentos

Amostras de OR das duas espécies foram administrados, nas doses de 200 mg/kg/dia e 400 mg/kg/dia e de CV e RE foram administrados nas doses de 100 mg/kg/dia. Todos foram incorporados na ração contendo caseína e/ou veiculado em uma solução de Tween 80 a 2% em água, num volume total de 0,1 mL, por gavagem.

3.8 Desenho Experimental

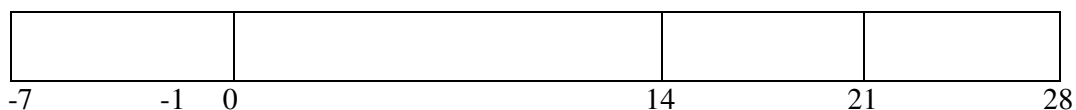
Foram realizados dois protocolos experimentais, como apresentados a seguir, nos itens 3.8.1 e 3.8.2.

3.8.1 Protocolo 1: Tratamentos na ração de caseína e desafio com SCO a 20%

O seguinte protocolo foi seguido para tratar os animais controles e alérgicos por 29 dias (dia -1 ao dia 28) com ração de caseína suplementada. As mamadeiras contendo água de todos os grupos foram substituídas por SCO 20% na semana do desafio oral. A eutanásia ocorreu no dia 28 (7 dias de desafio alergênico).

Tabela 2: Protocolo de tratamento 1.

Grupos	Protocolo de Imunização	Dietas
1	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação
2	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com OR de Copaíba (200 mg/kg/dia)
3	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com OR de Copaíba (400 mg/kg/dia)
4	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com a fração diterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
5	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com a fração sesquiterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
6	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)
7	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação
8	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com OR de Copaíba (200 mg/kg/dia)
9	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com OR de Copaíba (400 mg/kg/dia)
10	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com a fração diterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
11	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com a fração sesquiterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
12	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)



Escala Temporal (Dias)

Dia -7 até dia -1 - Vermifugação;

Dia -1 – Início do consumo da ração de caseína com os tratamentos até a eutanásia;

Dia 0 – Imunização primária;

Dia 14 – Imunização secundária;

Dia 21 – Desafio com troca da mamadeira de água por mamadeira contendo SCO a 20%;

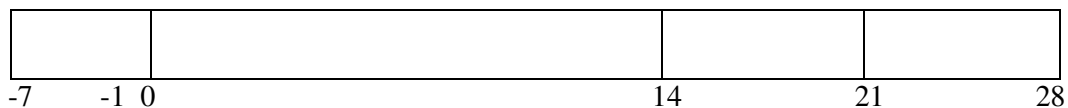
Dia 28 – Eutanásia dos animais para avaliação sorológica e histopatológica.

3.8.2 Protocolo 2: Tratamentos na ração de caseína até desafio e gavagem durante o desafio alérgico

O protocolo a seguir foi utilizado para tratar os animais controles e alérgicos por 29 dias. Do dia -1 ao dia 21 o tratamento foi com ração de caseína suplementada e do dia 22 ao dia 28 a ração foi substituída por ração contendo OVA. Os animais foram eutanasiados no dia 28 (7 dias de desafio alérgico).

Tabela 3: Protocolo de tratamento 2

Grupos	Protocolo de Imunização	Diets
1	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação + Gavagem - Veículo (Sol.Tween 80 a 2%)
2	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - OR de Copaíba (200 mg/kg/dia)
3	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Fração diterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
4	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Fração sesquiterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
5	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)
6	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação + Gavagem - Veículo (Sol.Tween 80 a 2%)
7	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - OR de Copaíba (200 mg/kg/dia)
8	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Fração diterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
9	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Fração sesquiterpênica da Copaíba (100 mg/kg/dia)
10	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada + Gavagem - Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)



Escala Temporal (Dias)

Dia -7 até dia -1 - Vermifugação;

Dia -1 – Início do consumo da ração de caseína com os tratamentos até o desafio alérgico (dia 21);

Dia 0 – Imunização primária;

Dia 14 – Imunização secundária;

Dia 21 – Desafio com troca de ração balanceada de Caseína com os tratamentos pela ração balanceada de OVA e início da gavagem com o com os tratamentos, até a eutanásia;

Dia 28 – Eutanásia dos animais para avaliação sorológica e histopatológica.

3.8.3 Controle sem tratamento e controle ativo

Para os animais sem tratamento (sensibilizados ou não), foram utilizadas: ração de caseína sem suplementação e/ou solução de Tween 80 a 2% (veículo) por gavagem, num volume total de 0,1mL. O tween 80 é um tensoativo não iônico.

Como controle ativo, foi utilizado o glicocorticóide Dexametasona (Dexametasona fosfato de sódio, Decadron ® 4mg/mL, Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A., Campinas, São Paulo), na dose de 0,4 mg/kg/dia, incorporada à ração contendo caseína e/ou em solução de salina estéril (0,9% cloreto de sódio) (TATSUO et al., 1994), por gavagem, num volume total de 0,1 mL.

3.9 Eutanásia

Após 7 dias de consumo voluntário de dieta contendo OVA ou SCO a 20%, os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de quetamina e 20 mg/kg de xilazina para retirada do sangue e reparação do soro. Posteriormente, e ainda sob anestesia, sofreram eutanásia através de deslocamento cervical.

O soro e os órgãos foram retirados e congelados a -20°C (soro e jejuno proximal) ou fixados em formol (jejuno distal).

3.10 Obtenção de soro

Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 r.p.m.) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior análise da presença de anticorpo IgE.

3.11 Histopatologia

O intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, e foi utilizado o critério baseado em FERRARIS et al. (1992). A alergia alimentar foi avaliada morfológicamente pelo segmento do jejuno distal, que foi retirado e fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções decrescentes de alcoóis e incluído em parafina. A partir desses blocos, cortes de 4 μm foram obtidos e as lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), Periodic Acid Schiff (P.A.S.), Alcian Blue pH 1,0 e Azul de toluidina. As técnicas estão descritas no anexo 1.

3.11.1 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra e sulfomucina (mucina ácida sulfatada)

Na avaliação da presença de muco intestinal, foram utilizadas as colorações de P.A.S (coloração para mucina neutra) e de Alcina Blue pH 1,0 (coloração para sulfomucina). Após colorações, para a análise do muco, foram capturadas imagens de três campos da porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software KS300 instalado em um analisador de imagens Kontron Eletronic/Carl Zeiss. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em m^2 P.A.S./campo e μm^2 A.B.1/campo.

3.11.2 Avaliação da hiperplasia de mastócitos e infiltrado de eosinófilos

Lâminas histológicas coradas pelo Azul de Toluidina, utilizadas para contagem de mastócitos, foram examinadas em microscópio óptico (OLYMPUS B201). A contagem foi realizada observando 20 campos aleatórios em um aumento de 40X ($53.333\mu\text{m}^2$ /campo) e o resultado expresso em número de mastócitos/campo.

Para a avaliação do infiltrado intestinal de eosinófilos, lâminas histológicas foram coradas pela HE e examinadas em microscópio óptico (OLYMPUS B201). A contagem de células foi realizada observando 10 campos aleatórios em um aumento de 40X (53.333 m^2 /campo) e o resultado expresso em número de eosinófilos/campo.

3.12 Avaliação do edema do intestino e do peso do tecido adiposo

A quantificação do edema foi realizada pela técnica de MOORE-OLUFEMI et al. (2005) modificada. Após a eutanásia, um pedaço de 1 cm do duodeno foi pesado (peso úmido) e seco em estufa a 56°C, por 24 horas, e novamente pesado (peso seco). Para avaliação da perda de água utilizou-se a fórmula: $\{(\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}) / \text{Peso seco}\}$.

O tecido adiposo da região periuterina também foi pesado (apenas peso úmido).

3.13 Dosagens enzimáticas das atividades de neutrófilos e de eosinófilos

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima de neutrófilos e sua dosagem reflete indiretamente a quantidade dessas células num tecido. Ela foi dosada no tecido do intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C, por meio do método anteriormente citado por KRAWISZ et al. (1984). O material foi pesado, macerado com solução tampão e centrifugado a 10.000 r.p.m. por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado, sendo adicionados de NaCl 0,2% gelado e de NaCl 1,6% com glicose 5% gelada. Feita uma nova centrifugação, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em tampão fosfato com HTAB 5% e re-homogeneizado por 30 segundos, um volume 1 mL das amostras foram congelados e descongelados seguidamente, 3x em nitrogênio líquido, submetidos novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 25 µl do sobrenadante foi adicionado em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), incubado com 50 µl de tampão com TMB/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 2N e a densidade óptica (O.D.) medida utilizando leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) no comprimento de onda

492 nm. A partir de uma curva padronizada no laboratório (neutrófilos recrutados com tioglicolato) e os valores de MPO expressos em unidade relativa / mg de tecido.

A peroxidase eosinofílica (EPO) é uma enzima de eosinófilos reflete indiretamente a quantidade desta célula. A EPO foi dosada no tecido do intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C . Este ensaio foi conduzido assim como descrito por STRATH et al. (1985). De forma sucinta, 100 mg do pulmão direito dos animais foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos com 1,9 mL de PBS. O material foi centrifugado a 12.000 g (especificamente 10.000 r.p.m. no rotor utilizado) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1,5 mL de salina 0,2% seguida de 1,5 mL de salina 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensão em 1,9 mL de solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio, HTAB 0,5 % em PBS. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75 μL de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços juntamente com 75 μL da solução do substrato (1,5 mM *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão tris-HCl 0,075 mM, pH 8,0 suplementado com H_2O_2 6,6 mM). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 50 μl de H_2SO_4 1 mol/L. A absorbância foi lida a 492 nm. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

3.14 Análise do malondialdeído para avaliação da peroxidação lipídica intestinal

Malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica. Sua análise foi realizada em fragmentos de intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C , por

método anteriormente descrito por WALLIN et al. (1993). O tecido (200 mg) foi homogeneizado adicionando-se 1 mL de PBS 1x. A curva padrão foi preparada a partir de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMTP - Fluka). A 500 µL desse homogeinato, curva-padrão e branco foi adicionado 1 mL da solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375%, ácido clorídrico 0,25 N). Os tubos contendo as amostras foram colocados em banho-maria (45-50°C) por 15 minutos. Posteriormente foram resfriados e adicionou-se 1,5 mL de butanol em cada tubo, que foram agitados em vórtex antes de serem centrifugados a 3000 r.p.m. por 10 minutos. As amostras foram plaqueadas em duplicata (200 µL/ poço do sobrenadante) em placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) e a reação foi lida em leitor de ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay) no comprimento de onda 535 nm. Esta etapa foi realizada rapidamente, pois a reação é contínua e a cor rosa observada se torna laranja, perdendo-se, assim, a leitura das amostras. A partir da curva padrão foi obtida uma equação e os valores foram expressos em nmol de MDA/ mg de tecido.

3.15 Avaliação da IgE anti-OVA

Os anticorpos IgE anti-ovalbumina foram dosados por ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay). Placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, Inc), na quantidade de 50 µL/poço, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) com 200 µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50 µL /poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50 µL da OVA-biotinilada (1 mg/mL) por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e

incubada, agora, com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:5000 (50 μ L/poço) por mais 45 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100 μ L/poço) e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras comparadas a esse valor.

3.16 Análise estatística

A análise das diferenças na resposta entre grupos relacionados foi feita pela análise de variância (ANOVA). Para comparações pareadas entre grupos foi usado ANOVA de Tukey. Nas análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foram feitas utilizando-se teste t de Student. O nível de significância foi considerado quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas com o auxílio dos softwares de estatística: GraphPad *InStat*® e GraphPad *Prisma*®3.