

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA

INSTITUTO DE SAÚDE E SOCIEDADE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANA BEATRIZ RODRIGUES LOPES

**EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
HEPÁTICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

SANTOS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANA BEATRIZ RODRIGUES LOPES

**EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
HEPÁTICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Paulo – *Campus* Baixada Santista como parte
dos requisitos para obtenção do título de
bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia R. Nagaoka

SANTOS

2021

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864e Lopes, Ana Beatriz Rodrigues.
 EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES HEPÁTICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES TIPO 1. / Ana Beatriz Rodrigues Lopes;
Orientadora Marcia Regina Nagaoka; Coorientador . --
Santos, 2021.
 49 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Nutrição) -- Instituto Saúde e
Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2021.

1. Glicogenólise. 2. Copaifera. 3. Diabetes
Mellitus. 4. Gluconeogênese. 5. Estresse oxidativo.
I. Nagaoka, Marcia Regina, Orient. II. Título.

CDD 613.2

Bibliotecária Daianny Seoni de Oliveira - CRB 8/7469

ANA BEATRIZ RODRIGUES LOPES

**EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
HEPÁTICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Paulo – *Campus* Baixada Santista como parte
dos requisitos para obtenção do título de
bacharel em Nutrição.

Aprovado em: 25 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Débora Estadella
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Patrícia da Graça Leite Speridião
Universidade Federal de São Paulo

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em meus caminhos acadêmicos e encorajaram a seguir meu coração.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram essenciais para que eu finalizasse meu projeto de pesquisa e escrita desta monografia. Assim, gostaria de deixar um agradecimento especial registrado a elas.

Agradeço especialmente à minha família, que é minha maior torcida e porto seguro. Minha eterna gratidão a todo amor, apoio e suporte incondicionais que sempre recebi de vocês para perseguir meus objetivos.

Agradeço à Professora Márcia, por acreditar em mim antes mesmo de eu me tornar sua aluna de Iniciação Científica, pela oportunidade de participar deste trabalho de pesquisa e pelos ensinamentos que levarei para além da minha vida acadêmica.

Agradeço as ajudas, o companheirismo, os aprendizados e a amizade das minhas colegas do laboratório 330. Vocês foram muito importantes para a realização desse trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de São Paulo *campus* Baixada Santista e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo privilégio de ter recebido ensino, pesquisa e extensão de qualidade oferecidos durante minha graduação em Nutrição.

Minha gratidão aos meus professores na UNIFESP, dos eixos comuns ao específico, pela formação sólida, humanizada, de conhecimento amplo, multidisciplinar e crítico que me concederam.

Agradeço aqueles que sempre me fizeram acreditar no meu potencial e capacidade para conseguir finalizar da melhor forma esta pesquisa, aos que tornaram minha jornada na graduação mais leve, divertida, muito especial e memorável e a todos que fizeram parte das famílias que ganhei em Santos.

RESUMO

O óleo de copaíba (OC) é óleo-resina proveniente da biodiversidade brasileira com propriedades medicinais evidenciadas cientificamente, mas pouco é estudado sobre seus efeitos na Diabetes Melito (DM).

Objetivos: analisar o efeito de três tipos de OC na atividade de enzimas antioxidantes (EAs) hepáticas e no metabolismo hepático de carboidratos em modelo experimental de DM tipo 1 (DM1).

Metodologia: ratos Wistar machos foram pré-tratados com os OCs *Officinalis*, *Langsdorffii* ou *Ducke* via gavagem por sete dias. A seguir, foi realizada a indução de DM1 por injeção IV de estreptozotocina (STZ); animais controle receberam citrato de sódio. Após cinco dias, os animais foram divididos em grupo bem alimentados e em jejum para a perfusão de fígado isolado *in situ*. Amostra de sangue foi utilizada para a dosagem das transaminases séricas (AST e ALT), de perfusatos para avaliação da viabilidade hepática (liberação de glicose e depuração de BSP) e de fígado para atividade das EAs (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase).

Resultados: Os OCs diminuíram a glicemia nos animais normais e aumentaram nos animais STZ. Entretanto, não alteraram os níveis séricos de AST e ALT e nem os parâmetros de viabilidade hepática, exceto *Langsdorffii* que aumentou a liberação hepática de glicose no grupo STZ/jejum. As EAs variaram conforme o grupo experimental e o estado metabólico, mas interessante que a CAT diminuiu em todos os grupos tratados com *Officinallis* e no grupo STZ/jejum tratado com *Langsdorffii*.

Conclusão: Os OCs estudados não promoveram lesão hepatocelular mas dependendo do OC tem efeitos metabólicos benéficos ou maléficos. Assim, é importante identificar a espécie do OC e seus efeitos antes do uso indiscriminado.

Palavras-chave: Copaifera. Diabetes Mellitus. Estresse oxidativo. Fígado. Glicogenólise. Gliconeogênese.

ABSTRACT

Copaiba oil (OC) is an oil-resin from Brazilian biodiversity with scientifically proven medicinal properties, but little is known about its effects on Diabetes Mellitus (DM).

Objectives: to analyze the effect of three types of OC on the activity of hepatic antioxidant enzymes (AEs) and on hepatic metabolism of carbohydrates in an experimental model of type 1 DM (DM1).

Methodology: male Wistar rats were pre-treated with OC *Officinalis*, *Langsdorffii* or *Ducke* via gavage for seven days. Then, the induction of DM1 was performed by IV injection of streptozotocin (STZ); control animals received sodium citrate. After five days, the animals were divided into a well-fed and fasted group for the *in situ* isolated liver perfusion. Blood sample was used to measure serum transaminases (AST and ALT), perfusates to assess liver viability (glucose release and BSP clearance) and liver for EAs activity (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase).

Results: OCs decreased blood glucose in normal animals and increased in STZ animals. However, they did not alter the serum levels of AST and ALT or the parameters of liver viability, except *Langsdorffii*, which increased the hepatic glucose release in the STZ/fasting group. The AEs varied according to the experimental group and the metabolic state, but interesting that the CAT decreased in all groups treated with *Officinalis* and in the STZ/fasting group treated with *Langsdorffii*.

Conclusion: The studied OCs did not promote hepatocellular damage, but depending on the OC, it has beneficial or harmful hepatic metabolic effects. Thus, it is important to identify the species of the OC and its effects before indiscriminate use.

Keywords: Copaifera. Diabetes. Gluconeogenesis. Glycogenolysis. Liver. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
BSP	Bromosulfaleína
C.	<i>Copaifera</i>
CAT	Catalase
DM	Diabetes Melito
DM1	Diabetes Melito tipo 1
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 Aspectos éticos e legais	18
3.2 Animais e grupos experimentais	18
3.3 Modelo experimental de Diabetes Melito tipo 1	18
3.3.1 Indução do modelo experimental	18
3.3.2 Teste de tolerância à glicose	19
3.4 Óleo de copaíba e administração	19
3.4.1 Análise cromatográfica do óleo de copaíba	19
3.4.2 Administração do óleo de copaíba	20
3.5 Eutanásia e coleta de material biológico	20
3.5.1 Perfusão <i>in situ</i> de fígado	20
3.5.2 Obtenção do soro	21
3.5.3 Preparo do homogenato de fígado	21
3.5.3.a Dosagem de proteínas totais do homogenato	22
3.6 Viabilidade e função hepática	22
3.7 Metabolismo de carboidratos: glicogenólise e gliconeogênese	23
3.7.1 Dosagem de glicogênio hepático	23
3.7.2 Gliconeogênese	23
3.8 Estresse oxidativo	23
3.8.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	23
3.8.2 Atividade da glutationala peroxidase (GPx)	24
3.8.3 Atividade da catalase (CAT)	25
3.9 Avaliação dos resultados	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Análise descritiva	26
4.2 Efeito do óleo de copaíba na glicemia	26
4.3 Marcadores de função hepática	27
4.3.1 Aminotransferases séricas	27

4.3.2 Depuração de bromossulfaleína (BSP)	27
4.3.3 Secreção de bile	27
4.4 Parâmetros relacionados ao metabolismo de carboidratos	31
4.4.1a Liberação de glicose no estado bem alimentado (glicogenólise) e no jejum (Gliconeogênese)	31
4.4.1b Conteúdo de glicogênio hepático	31
4.5 Estresse oxidativo	34
4.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	34
4.5.2 Catalase (CAT)	34
4.5.3 Glutathiona peroxidase (GPex)	34
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

As Copaiibeiras, plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* L. (Leguminosae-caesalpinioideae), são árvores de grande porte que atingem entre 30 a 40 metros de altura (Brito *et al.*, 2000; Veiga-Jr *et al.*, 2005), e são nativas das regiões tropicais da América Latina, onde mais de trinta espécies diferentes já foram descritas, sendo 16 delas exclusivas do Brasil (Masson, 2011). Também está presente no continente africano, onde quatro espécies foram descritas e uma espécie pode ter sido encontrada na Ásia (Martins-da-Silva *et al.*, 2008; Veiga *et al.*, 2001). Destacam-se nove espécies de *Copaifera* no Brasil e as mais abundantes são: *C. Officinalis* L., *C. reticulada* Ducke, *C. Langsdorffii* e *C. multijuga* Hayne (Martins-da-Silva, 2008; Pieri *et al.*, 2009).

Seus óleos são amplamente comercializados e consumidos, principalmente na região Amazônica, onde o conhecimento popular é proveniente da valorização da cultura, história e tradição do povo (Santana *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2017). Produzidos a partir do metabolismo secundário das Copaiibeiras ou Copaíbas, como produto de defesa da planta contra animais, fungos e bactérias e é obtido por exsudação dos troncos dessas árvores (Felipe e Bicas, 2017; Galúcio *et al.*, 2016; Lourenço *et al.*, 2009; Pieri *et al.*, 2009). Após a incisão, extrai-se um líquido viscoso, de sabor amargo e amadeirado que pode ser nomeado como "bálsamo", "óleo-resina" ou "óleo de copaíba" (Santana *et al.*, 2014). Apresenta viscosidade variável, coloração que transita entre amarelo pálido a castanho dourado ou escuro (sendo os de cores mais claras com maior teor de óleos essenciais), aroma característico e composição de ácidos terpenóides variados, em função da espécie, propriedades do solo, condições climáticas e período do ano em que foi extraído. (Galúcio *et al.*, 2016; Lourenço *et al.*, 2009; Pieri *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2017).

Normalmente, o óleo é administrado via oral na versão *in natura* ou ainda aplicado em forma de pomada. É amplamente consumido nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e popularmente conhecido por seus benefícios anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante e antimicrobiano já comprovados. Atualmente, faz parte da medicina natural e é comercializado em todo país, sendo indicado para usos terapêuticos diversos (Cardoso *et al.*, 2017; Lourenço *et al.*, 2009; Masson, 2011; Santana *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2017).

Somado às questões histórico-culturais, o Brasil é o maior produtor e exportador de óleo de copaíba, o qual representa cerca de 95% de toda a produção

de óleos-resina do país destacando-se como grande símbolo social e econômico da região Norte (Cardoso *et al.*, 2017; Masson, 2011).

Há relatos sobre o conhecimento das propriedades medicinais de cicatrização do óleo de copaíba pelos indígenas das tribos Tupi, Puinaves, Kaw e Makunas, advindo da observação de animais que se esfregavam nos troncos das árvores Copaíba para curar suas feridas. Já o denominavam Kupaiwa, do tupi. Posteriormente, esta denominação originou o nome Copaíba (Maciel *et al.*, 2002; Masson, 2011; Pieri *et al.*, 2009; Veiga Junior *et al.*, 2002).

Em 1587, Gabriel Soares de Sousa, colono português e senhor de engenho na Bahia, escreveu o “Tratado Descritivo do Brasil”, um dos mais importantes registros do Brasil quinhentista no qual referia-se à Copaíba como “árvore e erva da virtude” e mencionava o uso do óleo pelos europeus (Azevedo, 2015; Pieri *et al.*, 2009).

Personalidades históricas como o Padre José de Anchieta citavam o óleo de copaíba como potente cicatrizante, demonstrando que o conhecimento da Copaíba, seu óleo e propriedades medicinais já era popular e observado (Masson, 2011; Pieri *et al.*, 2009).

Estudos posteriores confirmaram essas propriedades já observadas e pesquisas recentes demonstraram também atividade antitumoral, antimelonoma, antiulcerogênica, antioxidante, antineoplásicas, tripanossomicidas, antibacteriana gram negativa e antifúngica do óleo, relacionadas com sua composição química (Cardoso *et al.*, 2017; Maciel *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008).

É composto por aproximadamente 28 ácidos diterpenos diferentes diluídos em óleos essenciais compostos por 72 sesquiterpenos já identificados (Rigamonte-Azevedo *et al.*, 2004). Veiga Junior *et al.* (2005) os apontam como os responsáveis pela atividade biológica do óleo.

Essas classes de substâncias estão sempre presentes nos óleos de copaíba, sendo os β -cariofileno e β -bisabolol os principais sesquiterpenos presentes e relacionados à atividade antiinflamatória, bactericida e antitumoral (Ames-Sibin *et al.*, 2018; Felipe e Bicas, 2017; Veiga Junior *et al.*, 2005).

Dentre os principais diterpenos, destacam-se os ácidos caurenóicos, polialítico, copálico, hardwickiico e colavenol. O ácido copálico é encontrado em todos os óleos de copaíba, seguido dos ácidos hardwickiico e caurenóico, encontrados em 42% e 30% dos óleos, respectivamente (Veiga Junior *et al.*, 1997; Masson, 2011).

Apesar da composição dos óleos variar conforme a espécie da Copaíba, o ácido copálico é considerado marcador do óleo de copaíba por ser o único encontrado em todos eles e por apresentar também propriedades curativas e atividade vaso relaxante, relaxante do músculo liso, anti-inflamatória e protetora de colite induzida por ácido acético (Cardoso *et al.*, 2017; Maciel *et al.*, 2002; Pieri *et al.*, 2009). Os diterpenos hardwickiico e o colavenol apresentam potente ação antitumoral, inibindo o seu crescimento (Maciel *et al.*, 2002).

Sendo assim, o óleo de copaíba vem sendo incorporado aos hábitos alimentares como uma tradição familiar, seja para prevenção ou tratamento de doenças (Santana *et al.*, 2014; Yamaguchi e Garcia, 2012). O uso popular no Diabetes Melito (DM) é conhecido, e especialmente na região norte do país é utilizado como fitoterápico por indivíduos que não têm acesso a remédios, produtos farmacêuticos e serviços de saúde (Cascon e Gilbert, 2000).

A prática do uso de plantas medicinais vem sendo incentivada por políticas públicas da Organização Mundial da Saúde e, assim, faz-se necessária uma abordagem científica dos constituintes do óleo para comprovar sua eficácia nesta patologia, pois até o momento, nenhum trabalho científico comprovou efeito benéfico do consumo do óleo no DM (Horácio *et al.*, 2017; Lourenço *et al.*, 2009).

A prevalência de DM vem aumentando rapidamente em todo o mundo, e o Brasil ocupa o quinto lugar na lista de países com maior prevalência da doença (International Diabetes Federation, 2019). DM é caracterizada por disfunção endócrina que altera o metabolismo de carboidratos, levando à hiperglicemia constante acompanhada de aumento do estresse oxidativo em diversos órgãos, decorrente da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou pelo comprometimento de defesas antioxidantes (Baynes e Thorpe, 1999; Carvalho *et al.*, 2018; Cerutti *et al.*, 1994; Takhtfooladi, 2016).

O estresse oxidativo desempenha papel importante no desenvolvimento das complicações do DM (Giacco e Brownlee, 2010). Vários estudos têm demonstrado que a hiperglicemia induz estresse oxidativo por diferentes mecanismos como a oxidação da glicose, glicação proteica não-enzimática, formação de produtos de glicação avançada e a via do polioliol (Atalay e Laaksonen, 2002; Maritim *et al.*, 2003).

Os níveis aumentados de glicose induzem a produção excessiva de EROs nas mitocôndrias, causando depleção de enzimas e levando à lesão celular (Vincent *et al.*, 2009; Brownlee, 2005). Assim, os antioxidantes têm a capacidade de eliminar as

Introdução

EROs protegendo o tecido do estresse oxidativo (Pham-Huy *et al.*, 2008). Portanto, terapias antioxidantes são importantes para a melhora na qualidade de vida dos indivíduos diabéticos.

Campos-Carraro *et al.* (2018) estudaram o efeito do óleo de copaíba (sem identificação da espécie) em modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina e observaram redução no estresse oxidativo, com atenuação da morte celular por apoptose e preservação da função do ventrículo direito e, conseqüentemente, da função cardíaca.

Levando em consideração a utilização e popularidade do consumo do óleo de copaíba para prevenção e tratamento de DM, e poucas pesquisas científicas relacionadas, o presente estudo visa analisar os efeitos de 3 tipos diferentes de óleo de copaíba na DM experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito de três diferentes tipos de óleos de copaíba (*C. Officinalis*, *C. Langsdorffii* e *C. Ducke*) no metabolismo de carboidratos e estresse oxidativo em fígados isolados e perfundidos de ratos normais e submetidos a modelo experimental de DM1 induzida por STZ.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em fígados de ratos normais e submetidos a modelo experimental de DM1:

- a) a viabilidade e função hepática pela liberação de glicose, secreção de bile e depuração de bromossulfaleína;
- b) o metabolismo de glicose:
 - glicogenólise pela dosagem do glicogênio e respectiva liberação de glicose, no estado bem alimentado;
 - gliconeogênese pela liberação de glicose no estado de jejum;
- c) o estresse oxidativo pela atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos e legais

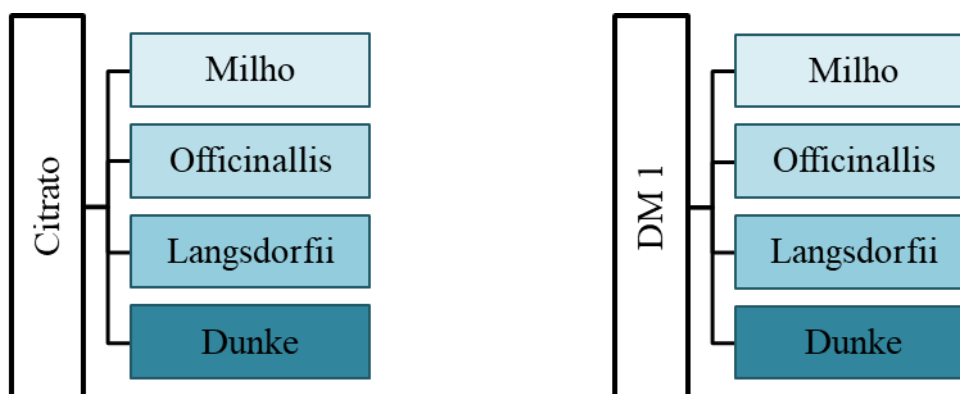
O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número de protocolo CEUA 5655010916 e todos os experimentos foram realizados de acordo com o “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (CIOMS e ICLAS, 2012).

3.2 Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar machos jovens adultos de aproximadamente 49 dias, criados e fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da UNIFESP, foram utilizados na pesquisa. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo de claro/escuro de 12 horas e 60 a 90% de umidade do ar e água e ração padrão *ad libitum* durante todo o estudo.

Os animais foram randomizados em grupos com n de 4 a 5 animais, como indica a figura abaixo:

Figura 1. Esquema dos grupos experimentais e respectivos óleos de copaíba.



3.3 Modelo experimental de Diabetes Melito tipo 1

3.3.1 Indução do modelo experimental

Diabetes melito tipo 1 (DM1) foi induzida por injeção IV de estreptozotocina (STZ), diluída em citrato de sódio 0,05 M, na concentração de 60 mg/kg peso corporal do animal. A confirmação da indução de DM1 foi realizada pela medida da glicemia utilizando glicosímetro Accu-Chek performa. Como controle da indução de DM1, animais receberam apenas citrato de sódio. Os valores de glicemia em jejum dos animais STZ foram considerados a partir de 300 mg/dL, de acordo com Abuohashish *et al.* (2013).

3.3.2 Teste de tolerância à glicose

Após sete dias de indução da DM1, os animais receberam uma dose (0,6 ml/kg peso corporal) de óleo de milho (controle) ou de copaíba (*Ducke*, *Officinallis* ou *Langsdorffii*) por gavagem uma hora antes da realização do teste. Para tanto, os animais tiveram restrição de ração, recebendo apenas água *ad libitum* durante a noite. A curva glicêmica foi realizada com injeção intraperitoneal de glicose (2g/kg de peso). Foi realizada a dosagem de glicose nos tempos 0 (antes da injeção), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção utilizando o glicosímetro Accu-Chek performa. A análise da glicemia dos animais foi obtida através da área sob a curva do gráfico da “glicose versus o tempo de análise”.

3.4 Óleo de copaíba e administração

Três tipos de óleo de copaíba (*C. officinalis* L., *C. reticulata* Ducke e *C. langsdorffii* Desf.) foram adquiridos comercialmente (Brasnatus Produtos Naturais, Brasil) e utilizados neste trabalho. Em alguns experimentos água foi utilizada como controle, sendo substituída por óleo de milho.

3.4.1 Análise cromatográfica do óleo de copaíba

Amostras dos 3 tipos de óleo de copaíba foram analisadas por cromatografia a gás (GC) com espectrometria de massa (GC-MS) em colaboração com as Prof^{as}. Dras. Miriam Anders Apel e Amélia T. Henriques da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para conhecimento da composição e certificação dos óleos.

Até o momento foi recebida somente a avaliação do óleo de copaíba *Langsdorffii* e *Reticulata* Ducke, apresentada na tabela abaixo. Compostos com menos de 1% não foram listados.

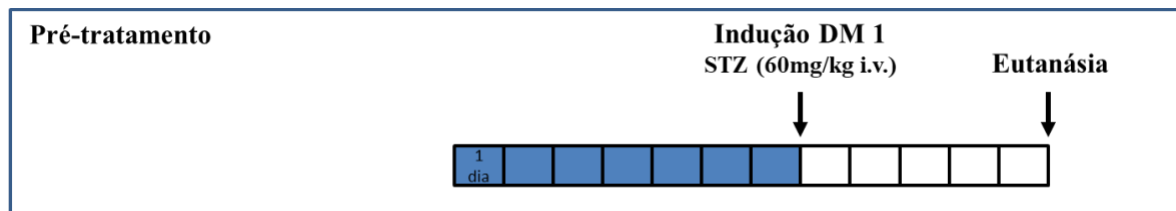
Tabela 1. Distribuição (%) dos principais componentes de *C. Langsdorffii* Desf. e *C. Reticulata* Ducke.

Composto (%)	Óleo de Copaíba	
	Langsdorffii	Reticulata Ducke
alfa-copaeno	11.50	5.78
alfa-cubebeno	1.40	
alfa-humuleno	2.77	6.85
alfa-transbergamoteno	12.94	6.93
betabisaboleno	17.59	4.20
beta-cariofileno	22.45	57.28
beta-elemeno	0.86	2.68
dehidro-aromadendrene	2.12	0.83
delta-cadineno	4.74	1.65
gama-gurjuneno		4.20
germacreno B	0.15	4.78
óxido de cariofileno	1.73	2.73

3.4.2 Administração do óleo de copaíba

A dose de cada óleo de copaíba administrada por gavagem foi de 0,6 ml/kg peso corporal dos animais (Brito *et al.*, 2000, Kobayashi *et al.*, 2011), uma vez ao dia. Animais controle receberam óleo de milho, ou em alguns experimentos, água.

Figura 2. Esquema da organização do tratamento dos animais com óleo de copaíba.



3.5 Eutanásia e coleta de material biológico

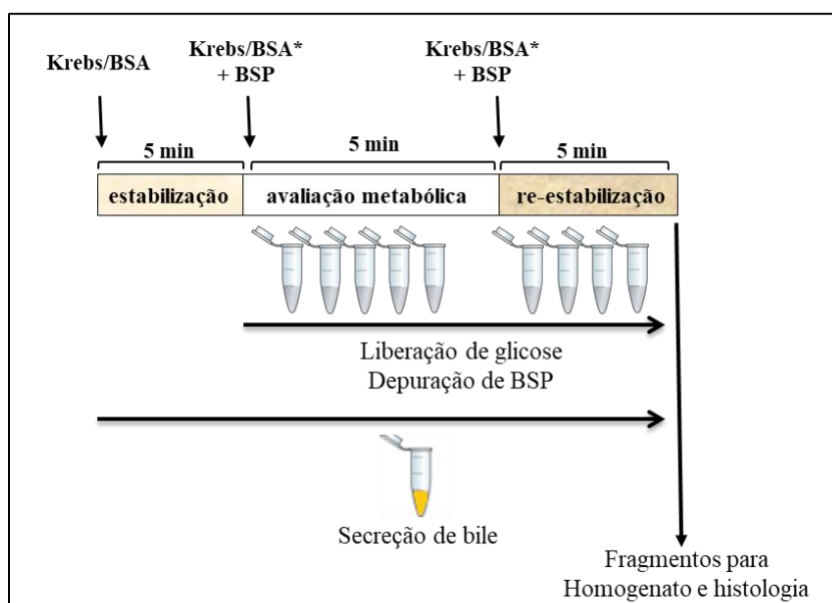
3.5.1 Perfusão *in situ* de fígado

A perfusão *in situ* do fígado isolado e exanguinado de rato realizou-se como descrito a seguir (Borges e Kouyoumdjian, 1992).

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1,3 g/kg), pesados e fixados na mesa cirúrgica. A cavidade abdominal foi aberta através de uma incisão na linha mediana. Retirou-se amostras de sangue pela aorta abdominal para dosagens séricas e, em seguida, as veias porta e o ducto biliar foram canulados. A cavidade torácica foi aberta e a veia cava inferior rapidamente canulada. O fluxo biliar foi monitorado ao longo de todo experimento e expresso em μL de bile por g de fígado por minuto ($\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

A seguir, ligou-se a veia cava inferior entre as confluências das veias renal e hepática e, assim, o fígado foi isolado. A exsanguinação foi feita com 200 mL de solução Krebs-Henseilet, pH 7,4, sendo dessa forma o sangue totalmente substituído pela solução, num fluxo constante de 3–4 mL/min por g de fígado. Após a exsanguinação, fechou-se o sistema com recirculação de 30 mL de solução Krebs contendo albumina (1 mg/mL) para estabilização do órgão as novas condições. Transcorridos 5 minutos, o líquido foi trocado por 30 mL da mesma solução, acrescidos de 3 mg de bromossulfaleína (BSP) e então alíquotas de perfusato foram recolhidas nos tempos 0, 1, 3, 5 minutos para avaliação metabólica analisada pela depuração do BSP e a liberação de glicose (Figura 3).

Figura 3. Esquema da análise dos parâmetros metabólicos na perfusão de fígado isolado de rato.



Em seguida, o líquido foi novamente trocado por 30 mL de solução Krebs contendo albumina, acrescidos de 3 mg de BSP. Recolheu-se alíquotas de perfusato nos tempos 0, 1, 3 e 5 minutos após a segunda adição de BSP para avaliação da sua depuração e a liberação de glicose. Esta fase é nomeada de “re-estabilização”, pois visa a reavaliação dos parâmetros metabólicos.

Ao final do experimento, o fígado foi retirado e pesado; fragmentos de fígado fixados em formaldeído (4%) em tampão fosfato-salina (PBS) até o momento do processamento histológico. Amostras também foram congeladas em isopentano e mantidas a -80°C.

3.5.2 Obtenção do soro

Para obtenção do soro, o sangue colhido da aorta abdominal durante a perfusão foi colocado em tubos de ensaio em banho-maria a 37°C. Após formação de coágulo, o soro foi separado por centrifugação a 3.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente e armazenado para análises bioquímicas.

3.5.3 Preparo do homogenato de fígado

Fragmentos de fígado foram triturados com auxílio do pistilo e gral na presença de nitrogênio líquido e homogeneizados em banho de gelo com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 µM, Triton X-100 0,1% (v/v) e Sacarose 0,25 M (1 mL por 100 mg de tecido). As amostras foram agitadas em banho de gelo por 15 minutos, e depois centrifugadas a 10.000 g 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80 °C para dosagens posteriores.

3.5.3.a Dosagem de proteínas totais do homogenato

A concentração de proteínas nas amostras foi obtida com o kit Pierce BCA Protein Assay (Termo Fisher Scientific). As amostras de homogenato foram diluídas 20 vezes e a curva padrão realizada com BSA (5 µg a 25 µg). Na microplaca foram adicionados 25 µL da amostra em triplicata, seguido de 200 µL da solução de trabalho devidamente diluída conforme indicação do kit. Após 30 minutos de incubação a 37°C foi feita a leitura da absorbância a 562 nm no espectrofotômetro Synergy HT (Biotek). Através dos valores obtidos na curva padrão, a quantidade de proteína em cada homogenato foi determinada em mg/mL e o valor corrigido levando em consideração a diluição utilizada.

3.6 Viabilidade e função hepática

A viabilidade dos fígados perfundidos foi avaliada pela depuração de bromossulfaleína (BSP), secreção de bile e liberação de glicose.

Para avaliação da função exócrina do fígado, a secreção de bile foi monitorada por coleta em tubos eppendorfs e pesada. Os resultados foram expressos em µL/min/g fígado.

Para dosagem de bromossulfaleína, em alíquotas (0,1 ml) de perfusato foram adicionados 0,7 ml de tampão fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,09M pH 10,6 e a absorbância lida em 580 nm. Após adição de tampão fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 2M para converter o BSP em sua forma sem cor, efetuou-se novamente a leitura da absorbância. A diferença das absorbâncias representa a absorbância do BSP. A partir da curva de decaimento do BSP (%) em função do tempo de perfusão, foi calculada a meia-vida de eliminação (min) e os resultados expressos em relação ao peso do fígado (min/g fígado).

A determinação da glicose nos perfusatos foi realizada por método enzimático utilizando-se o kit (Glicose PAP) da Labtest Diagnóstica (Brasil). Os resultados foram expressos em mg glicose liberada por g de fígado.

A dosagem das atividades da aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) foram feitas segundo especificações do kit utilizado (Labtest Diagnóstica, Brasil). A cinética enzimática foi medida por 3 minutos em 340 nm no espectrofotômetro Hitachi U2000 e os resultados da determinação enzimática expressos em U/l.

3.7 Metabolismo de carboidratos: glicogenólise e gliconeogênese

3.7.1 Dosagem de glicogênio hepático (Carrol *et al*, 1956)

Para avaliação do efeito do óleo de copaíba na glicogenólise, a perfusão de fígado foi realizada no estado bem alimentado, isto é, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

A determinação dos estoques de glicogênio realizou-se após a extração em meio alcalino, seguida da reação colorimétrica utilizando a mistura antrona-ácido sulfúrico como reagente cromogênico. O princípio da reação baseia-se na reação dos resíduos de glicose com a antrona. A quantificação foi realizada a partir de uma curva padrão de glicose.

3.7.2 Gliconeogênese

Para avaliação do efeito do óleo de copaíba na gliconeogênese, os animais foram submetidos a jejum com acesso livre a água e privação de ração na noite anterior a realização da perfusão de fígado.

Avaliou-se a gliconeogênese a partir da liberação de glicose pelo fígado perfundido na presença de lactato 2 mM associada a presença de piruvato 0,2 mM.

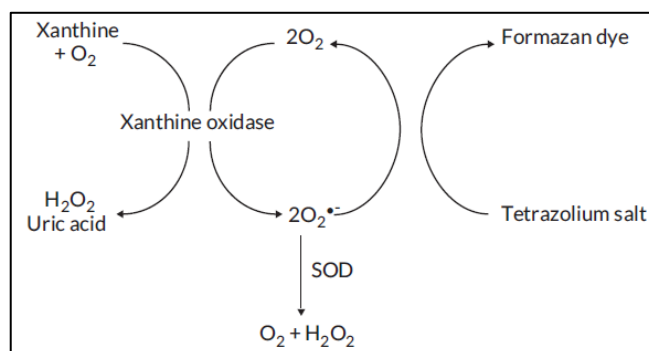
3.8 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado pela atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) utilizando os kits da Cayman.

3.8.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O kit utiliza o sal de tetrazólio para detecção dos radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina oxidase, conforme esquema abaixo:

Figura 4. Geração de radicais superóxido pela xantina oxidase e hipoxantina oxidase.



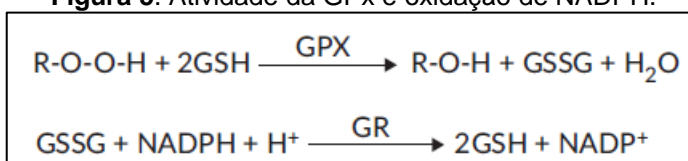
Para tanto foram incubados 10 µL de homogenato (aproximadamente X proteína) a 200 µL do reagente "radical detector, contendo o sal de tetrazólio (concentração não informada). A seguir foi adicionado 20 µL de xantina oxidase

(concentração não informada) e incubado por 30 min a temperatura ambiente e a absorbância lida a 440-460 nm. Curva padrão com a SOD (U/ml) foi realizada. A partir dos dados da curva padrão foram calculadas as atividades das amostras e expressa como U/mL, sendo 1 U definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% da dismutação do radical superóxido.

3.8.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

O kit mede a atividade GPx indiretamente pela reação acoplada com glutathiona redutase (GR). Glutathiona oxidada (GSSG), produzida sob redução do hidroperóxido pela GPx, é reciclada ao seu estado reduzido pela GR e NADPH:

Figura 5. Atividade da GPx e oxidação de NADPH.



A oxidação de NADPH a NADP⁺ é acompanhada pela diminuição na absorbância em 340 nm. Sob condições em que a atividade GPx é velocidade limitante, a velocidade da diminuição em A₃₄₀ é diretamente proporcional a atividade GPx na amostra.

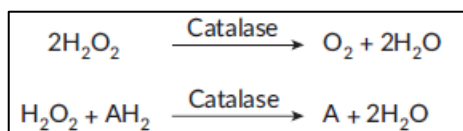
Para o ensaio, a 100 µL de tampão de ensaio (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo EDTA 5 mM) foram incubados 50 µL de co-substrato contendo NADPH, glutathiona e glutathiona redutase (cujas concentrações não foram informadas pelo kit) e 20 µL de homogenato (aproximadamente 30 µg de proteína), devidamente diluído em Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo EDTA 5 mM e BSA 1 mg/ml. Ao final foram adicionados 20 µL de hidroperóxido de cumene e a absorbância lida em 340 nm por 5 min, realizando uma leitura a cada minuto. Como controle positivo foi utilizada amostra de glutathiona peroxidase fornecida no kit.

A velocidade da reação (ΔA₃₄₀/min) foi calculada e a atividade da GPx foi calculada considerando o coeficiente de extinção do NADPH de 0,00373 µM⁻¹ (ajustado para o caminho ótico da solução no poço de 0,6 cm). Os resultados foram expressos como nmol/min/ml.

3.8.3 Atividade da catalase (CAT)

O kit utiliza a função peroxidase da CAT para determinação da atividade enzimática.

Figura 6. Atividade da catalase.



Este método é baseado na reação da enzima com metanol na presença de uma concentração ótima de H_2O_2 . O formaldeído produzido é medido colorimetricamente com 4-amino-3-hidrazina-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. Purpald forma especificamente um heterociclo bicíclico com aldeídos, o qual sob oxidação muda de sem cor para cor roxa.

Para o ensaio foram incubados 100 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 30 μL de Metanol, 20 μL de homogenato (aproximadamente 150 ng), 20 μL de peróxido de hidrogênio a temperatura ambiente (25°C) por 20 minutos. Após este período, 30 μL de hidróxido de potássio 10 M e 30 μL do reagente Purpald foram adicionados e mantidos a 10 minutos. Ao final 10 μL de periodato de potássio 35 mM foram adicionados e após 5 minutos a absorbância lida em 540 nm. A curva padrão foi realizada com catalase formaldeído nas concentrações de 0 a 75 μM e controle positivo foi utilizada a catalase hepática bovina fornecida pelo kit.

As concentrações de formaldeído das amostras foram calculadas a partir da curva padrão e utilizadas no cálculo da atividade da CAT. Os resultados foram expressos em nmol/min/mL.

3.9 Avaliação dos resultados

Os resultados foram expressos por média \pm EPM e analisados pelo programa GraphPad Prism (version 6.0). A análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey quando necessário, foi utilizado. O nível de significância para rejeição da hipótese nula considerado foi inferior ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

Serão apresentados os resultados do efeito de diferentes tipos de óleo de copaíba no metabolismo da glicose e no estresse oxidativo em fígados de ratos normais e submetidos ao modelo experimental de diabetes tipo I.

Inicialmente, o controle era realizado com água e foi gradualmente mudado para óleo de milho. Em função da necessidade de isolamento social devido a pandemia da COVID-19, infelizmente não foi possível completar os grupos/experimentos e algumas comparações ainda serão com a água como controle.

4.1 Análise descritiva

A Tabela 2 apresenta os dados descritivos dos grupos experimentais estudados neste trabalho. Pode-se observar que não houve diferença significativa no peso dos animais ou do fígado de todos os grupos experimentais utilizados. A relação corpo/fígado se manteve dentro da normalidade (4-5%).

4.2 Efeito do óleo de copaíba na glicemia

Para analisar o efeito do óleo de copaíba na glicemia, realizamos curva glicêmica com os 3 tipos de óleo de copaíba em animais controle e diabéticos. Verificou-se que nos animais normais (Figura 7A), todos os óleos de copaíba estudados são capazes de impedir o aumento de glicemia como o observado no animal pré-tratado com óleo de milho (controle). Interessante, os óleos de copaíba *Officinallis* e *Langsdorffii* parecem ser mais eficientes neste efeito hipoglicêmico quando analisada a glicemia ao longo do tempo.

Já nos animais diabéticos (STZ) (Figura 7B), verifica-se que os animais que receberam o pré-tratamento com o óleo de copaíba apresentaram glicemia inicial (tempo 0) maior que a dos animais controle (milho). Além disso, nos animais tratados com óleo de copaíba observa-se que o pico de glicemia é mais precoce (30 minutos) que o controle (60 minutos) com consequente decaimento da glicemia atingindo valores próximos do controle após 2h, principalmente os óleos de copaíba *Officinallis* e *Langsdorffii*.

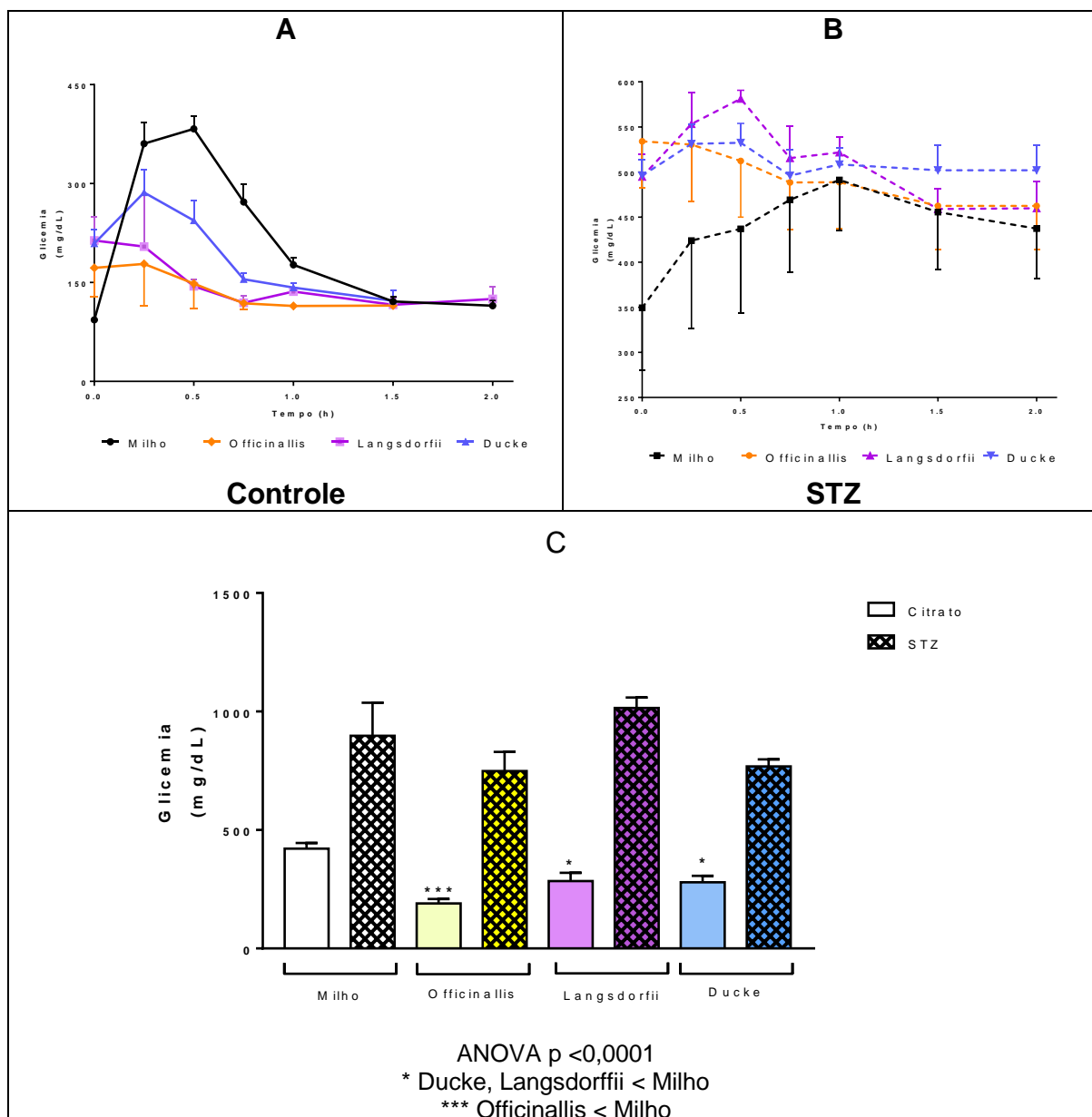
Quando calculada a área sob a curva (Figura 7C), verificou-se que nos animais normais, todos os óleos de copaíba apresentaram diferença estatisticamente significativa na glicemia quando comparado ao controle (milho). Já nos animais diabéticos STZ, este efeito não foi observado.

Tabela 2. Dados descritivos dos animais utilizados nos grupos experimentais estudados.

	H₂O		Milho	Officinallis		Langsdorffii		Ducke
	CTR	STZ	CTR	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR
N	4	4	6	12	8	14	8	7
Animais (g)	276 ± 14	235 ± 10	247 ± 15	250 ± 9	280 ± 19	262 ± 10	253 ± 10	246 ± 15
Fígado (g)	12,0 ± 0,7	10,3 ± 0,8	11,9 ± 0,4	11,0 ± 0,4	11,5 ± 0,7	11,0 ± 0,5	11,0 ± 0,6	11,3 ± 0,8
Relação corpo/fígado	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,2	4,4 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,2

Os animais foram pesados ao longo do tratamento e o fígado foi pesado ao final da perfusão de fígado para avaliação da razão fígado/corpo dos animais.

Figura 7: Curva glicêmica em ratos submetidos à modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba (média ± EPM).



Legenda: Após indução da DM1, os animais receberam uma dose (0,6 ml/kg peso corporal) de óleo de milho (controle) ou de copaíba (Ducke, Officinallis ou Langsdorffii) por gavagem 1h antes da realização do teste. A curva glicêmica foi realizada em animais em jejum com injeção ip de glicose (2g/kg de peso) e a dosagem de glicose medida nos tempos 0 (antes da injeção), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção utilizando o glicosímetro Accu-Chek performa. (N=4 animais por grupo).

4.3 Marcadores de função hepática

4.3.1 Aminotransferases séricas

A Figura 8 apresenta a atividade sérica das enzimas ALT e AST após o tratamento dos animais com os diferentes tipos de óleo de copaíba e após indução do modelo experimental de Diabetes (STZ). Não houve diferença significativa entre os grupos estudados independente da enzima, do óleo utilizado e modelo experimental. O número de experimentos precisa ser completado, mas aparentemente os diferentes tipos de óleo de copaíba utilizados na dosagem selecionada não promove inflamação sistêmica.

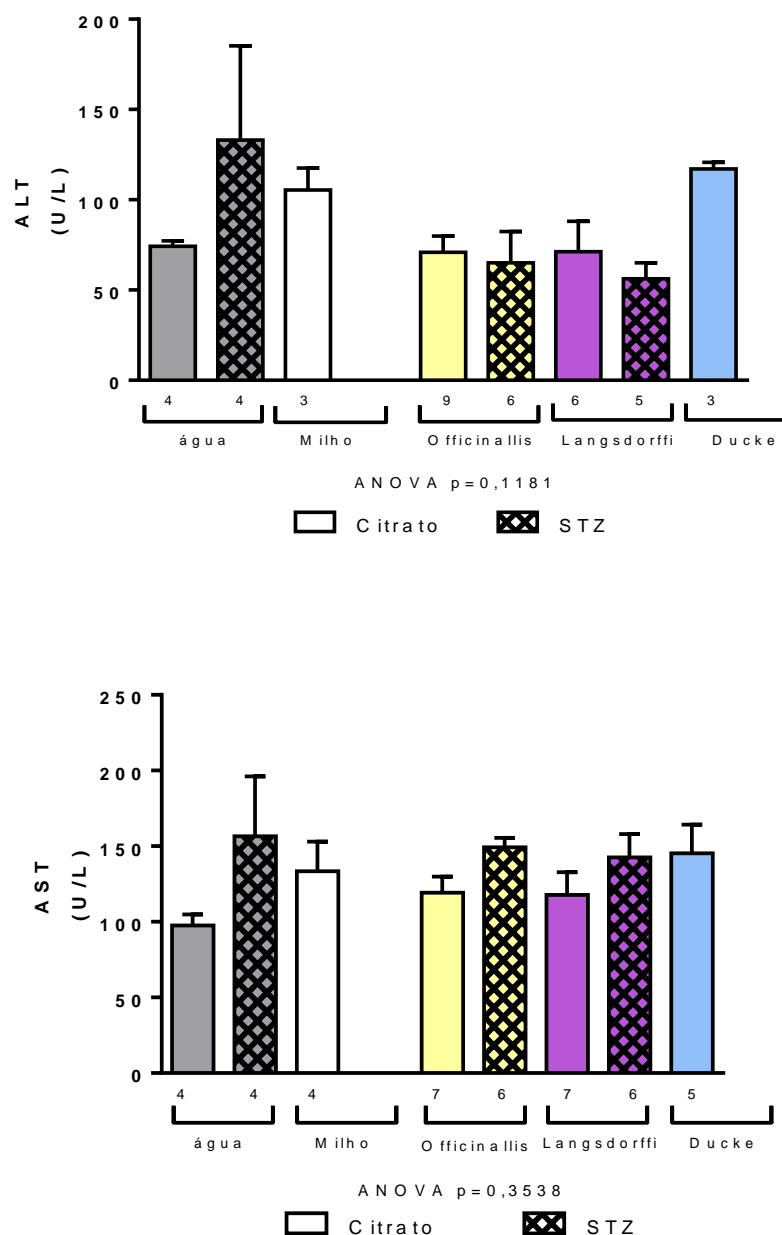
4.3.2 Depuração de bromossulfaleína (BSP)

Para avaliar o trânsito intracelular, isto é, a capacidade do fígado de captar algo (no caso BSP) do meio extracelular e secretar na via biliar, adicionou-se BSP ao líquido de perfusão e a sua depuração foi avaliada. Como observa-se na Figura 9, não houve diferença significativa (ANOVA, $p=0,1012$) entre os grupos estudados, embora houve aumento na meia vida de eliminação do BSP no grupo STZ pré-tratado com Langsdorffii.

4.3.3 Secreção de bile

Como observa-se na Figura 10, o pré-tratamento com os diferentes tipos de óleo de copaíba não alterou a secreção de bile pelo fígado de ratos normais e os diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ).

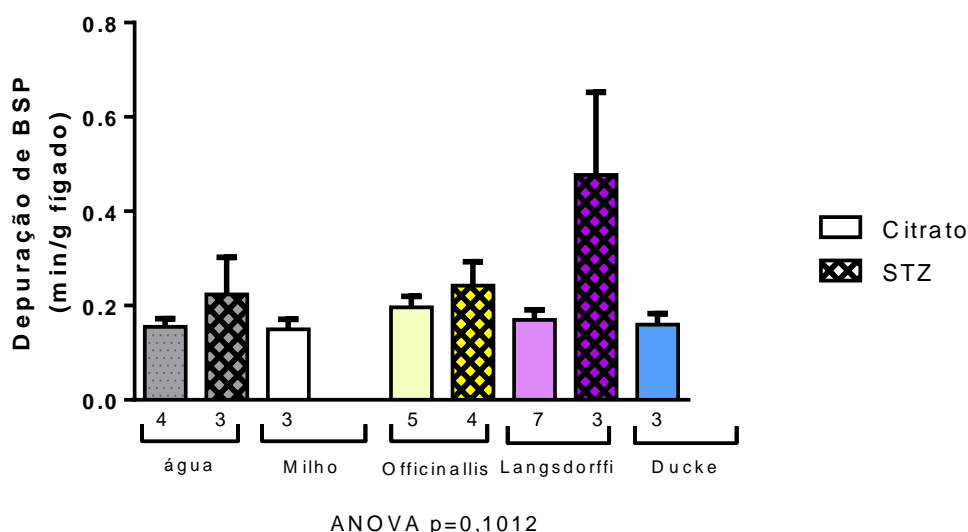
Figura 8: Atividade (U/L) da enzima sérica alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) de ratos submetidos à modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média ± EPM).



Legenda: A dosagem da atividade da alanino-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) no soro dos ratos foi feita incubando-se 0,05 mL do soro com 0,25 mL da solução de reação a 37°C por 30 min. Após adição do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina 1 mM), a reação foi interrompida com a adição de NaOH 0,4 M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu). Os resultados foram expressos em U/L, baseado nas respectivas curvas padrão.

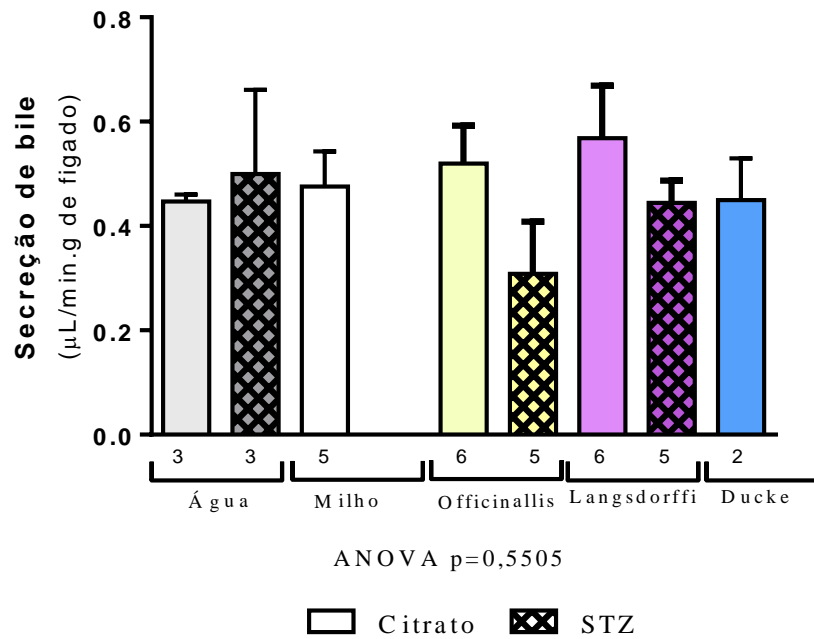
Resultados

Figura 9. Depuração da bromosulfaleína (BSP) pelo fígado de ratos submetidos à modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média \pm EPM).



Legenda: Alíquotas do perfusato foram incubadas com tampão fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) pH 10,6 e a absorbância foi lida em 580 nm. A seguir foi adicionado tampão fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 2M e efetuada novamente a leitura da absorbância. A diferença das absorbâncias representa a absorbância do BSP. A depuração de BSP foi expressa em meia-vida de eliminação (min) e relativo ao peso do fígado (min/g fígado).

Figura 10. Secreção de bile pelo fígado de ratos submetidos à modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média \pm EPM).



Legenda: A bile foi continuamente coletada em tubos ependorfs e pesada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ fígado.

4.4 Parâmetros relacionados ao metabolismo de carboidratos

4.4.1a Liberação de glicose no estado bem alimentado (glicogenólise) e no jejum (gliconeogênese)

A Figura 11 apresenta os resultados da liberação de glicose pelo fígado perfundido de ratos normais e diabéticos (STZ) no estado bem alimentado, a fim de avaliar a glicogenólise, e no estado de jejum para avaliação da gliconeogênese.

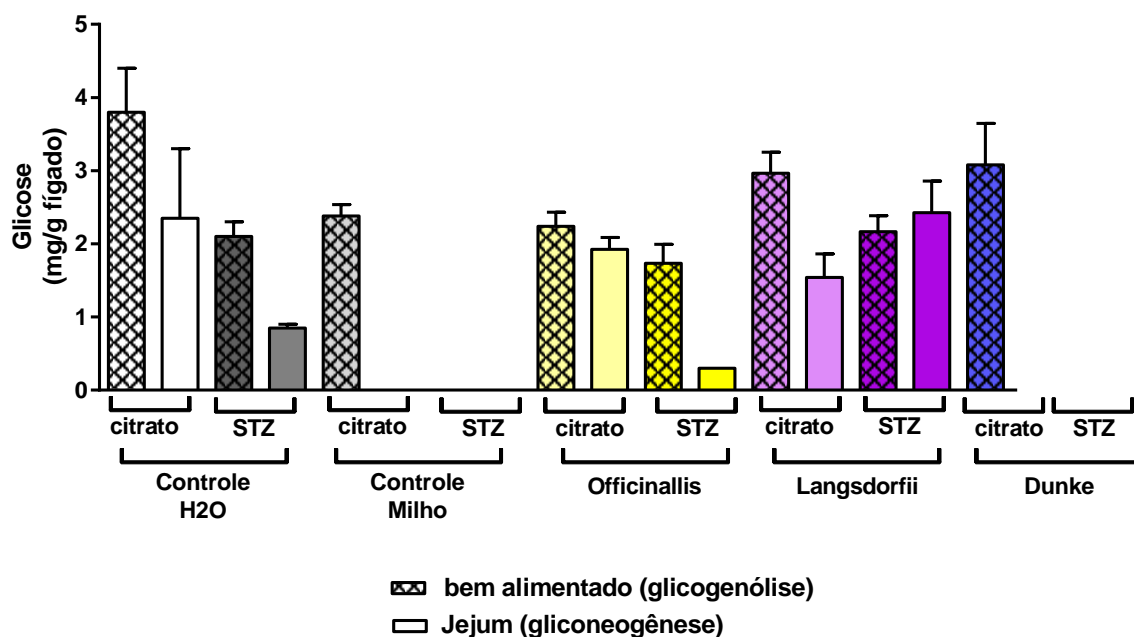
Observa-se, no estado bem alimentado, que há maior liberação de glicose no grupo citrato tratado com água em relação aos grupos tratados com óleo, mas não apresentam diferença estatisticamente significativa. No grupo STZ, a liberação de glicose pelo fígado de animais tratados com água é menor quando comparada ao respectivo grupo citrato, porém não há diferença entre os grupos STZ tratados com óleo de copaíba. Desta forma, os resultados sugerem que os óleos de copaíba utilizados não interferem na glicogenólise tanto em animais controle (citrato) quanto diabéticos (STZ).

Já no jejum, observamos no pré-tratamento com água menor liberação de glicose nos animais STZ que nos animais citrato. Este mesmo perfil se observa no pré-tratamento com *Officinallis*. Entretanto, no pré-tratamento com *Langsdorffii* não há diferença na liberação de glicose entre os animais citrato ou STZ. Interessante, os animais STZ pré-tratados com *Langsdorffii* apresentaram maior (ANOVA $p = 0,0094$) liberação de glicose que os animais STZ tratados com água ou *Officinallis*.

4.4.1b Conteúdo de glicogênio hepático

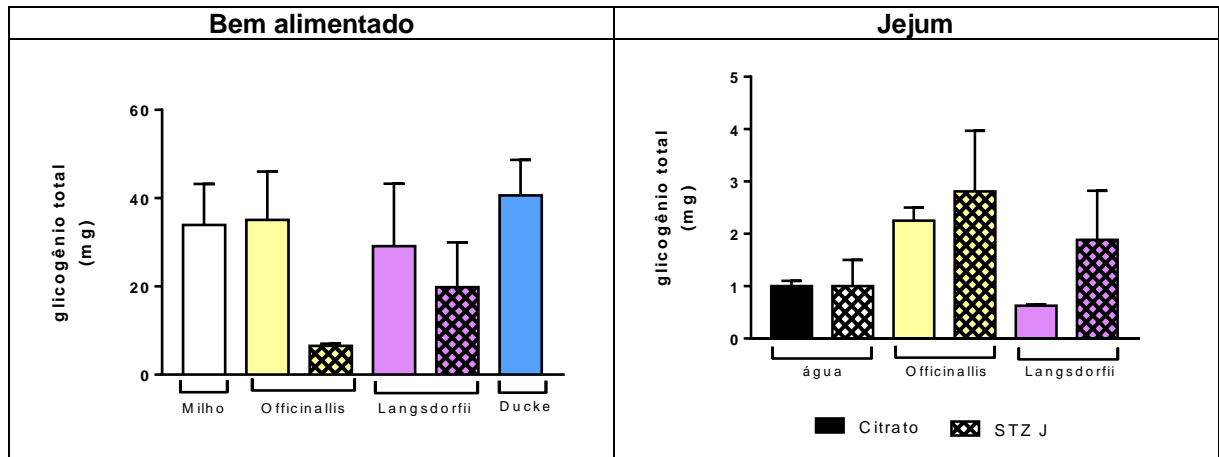
O conteúdo de glicogênio hepático foi maior nos animais no estado bem alimentado que nos animais em jejum (Figura 12). Nos animais no estado bem alimentado observamos menor conteúdo de glicogênio nos animais STZ pré-tratados com óleo de copaíba *Officinallis* ou *Langsdorffii*. Já nos animais em jejum, apesar de níveis baixos, verificou-se níveis mais altos de glicogênio nos animais pré-tratados com *Officinallis*.

Figura 11. Liberação de glicose pelo fígado perfundido de ratos submetidos à modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média \pm EPM).



Legenda: A determinação da glicose nos perfusatos foi realizada por método enzimático utilizando-se o kit (Glicose PAP) da Labtest Diagnóstica (Brasil). Os resultados foram expressos em mg glicose liberada por g de fígado. n = 3-6 animais

Figura 12. Conteúdo de glicogênio em fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média \pm EPM).



Legenda: Fragmento de fígado foi separado no início e armazenado em KOH 30%. A extração foi realizada pelo método descrito por SEIFTER et al., 1950, utilizando antrona e ácido sulfúrico.

4.5 Estresse oxidativo

A avaliação do efeito do pré-tratamento com os diferentes tipos de óleo de copaíba no estresse oxidativo hepático foi realizada pela medida da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase.

Para tanto foram realizados ensaios prévios para padronização das quantidades ideais de proteína do homogenato de fígado a serem utilizadas.

4.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A Figura 13 apresenta os resultados da atividade de SOD citoplasmática no fígado dos grupos estudados.

O pré-tratamento com água ou com *Langsdorffii* não altera a atividade enzimática da SOD em todos os grupos estudados, i.e, citrato e STZ e independente do estado metabólico (bem alimentado ou jejum). Interessante notar que o pré tratamento com *Officinallis* altera significativamente (ANOVA $p=0,0122$) a atividade da SOD nos grupos estudados: a atividade da SOD no grupo citrato-jejum ($p=0,0296$) é menor que no grupo STZ-jejum e relativamente menor ($p=0,0662$) que no grupo citrato-bem alimentado.

4.5.2 Catalase (CAT)

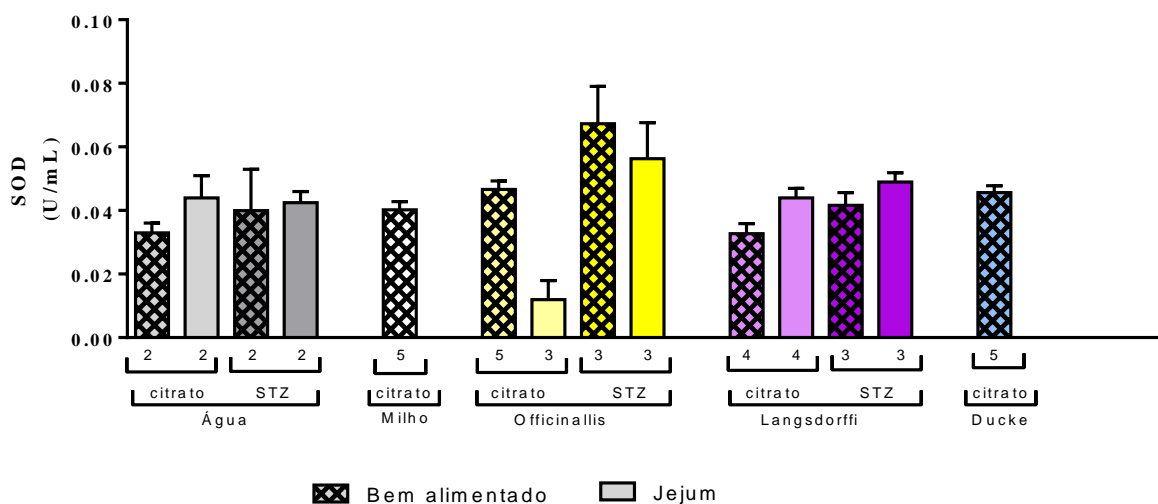
Como apresentado na Figura 14, os resultados da atividade da catalase se diferenciaram de acordo com o estado metabólico (Bem alimentado ou jejum) e o tipo de óleo utilizado. Nos animais pré-tratados com água verificou-se maior atividade da CAT nos animais bem alimentados que em jejum. No grupo *Officinallis* não houve diferença entre grupos independente do modelo experimental ou estado metabólico. Já nos animais tratados com *Langsdorffii*, há menor atividade da CAT nos animais STZ e neste grupo o jejum diminui a atividade da CAT.

4.5.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada apenas nos animais bem alimentados e não verificou-se nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 15).

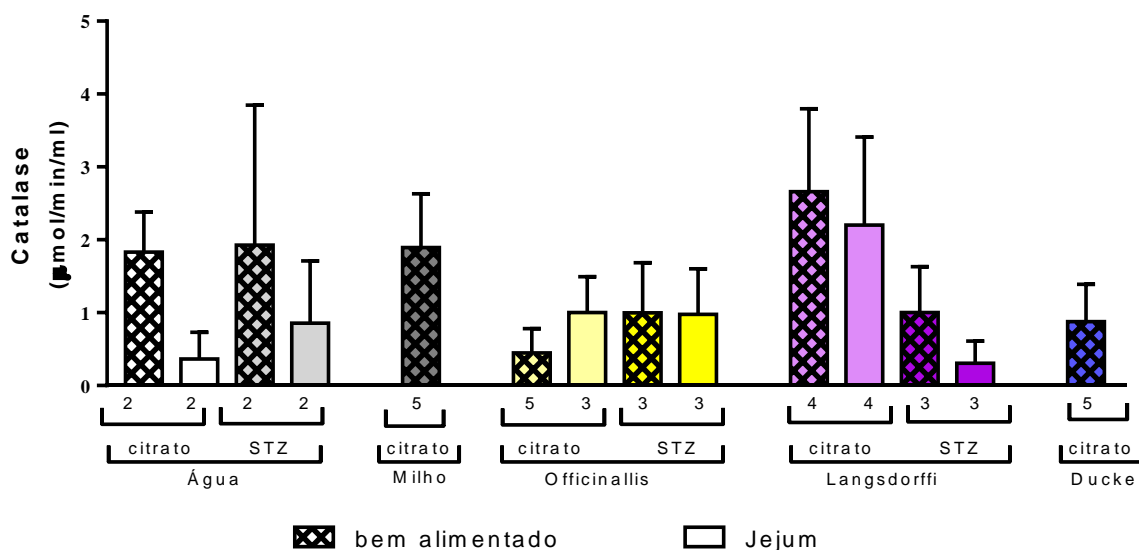
Resultados

Figura 13. Atividade enzimática (U/mL) da superóxido dismutase (SOD) em fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média ± EPM).



Legenda: O ensaio foi realizado conforme instruções do kit da Cayman.

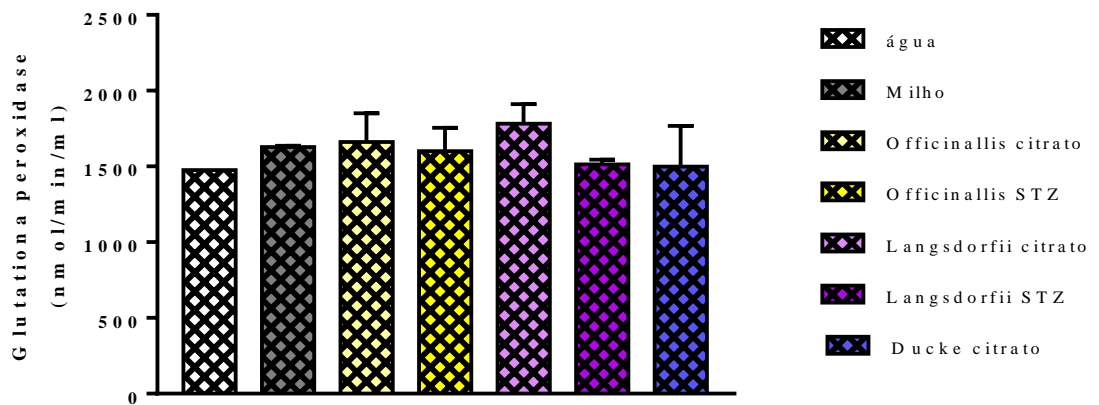
Figura 14. Atividade enzimática (µmol/min/ml) da catalase (CAT) em fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média ± EPM).



Legenda: O ensaio foi realizado conforme instruções do kit da Cayman.

Resultados

Figura 15. Atividade enzimática (nmol/min/ml) da g em fígado de glutatona peroxidase em fígado de ratos submetidos ao modelo experimental de diabetes tipo 1 (STZ) e pré-tratados com os diferentes tipos de óleo de copaíba por 7 dias (média \pm EPM).



Legenda: O ensaio foi realizado conforme instruções do kit da Cayman.

DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o efeito do óleo de copaíba no metabolismo hepático de animais submetidos a modelo experimental de diabetes tipo I (DM1) e animais controle (citrato). É um trabalho em andamento e alguns experimentos ainda precisam ser completados para melhor avaliação.

Poucos estudos científicos relatam o efeito do óleo de copaíba no fígado, apesar de ser o principal órgão no metabolismo de fármacos ou substâncias xenobióticas, e o óleo de copaíba ser amplamente utilizado pela população, em especial no centro-oeste do Brasil, para vários fins inclusive no Diabetes. Na literatura são demonstradas atividades anti-inflamatória, imunomoduladora, cicatrizante e outras propriedades medicinais dos diferentes tipos de óleo de copaíba.

Desta forma, o presente estudo analisou o metabolismo da glicose e o estresse oxidativo em animais com DM1 induzida por STZ, droga citotóxica para células beta-pancreáticas que leva o animal a desenvolver condições fisiopatológicas que fornecem parâmetros bioquímicos e clínicos semelhantes à síndrome diabética (Radenkovi *et al.*, 2015). Este é um modelo experimental clássico utilizado para simular a doença *in vivo* (Lenzen, 2007) e foi escolhido uma vez que estudos têm observado efeitos antioxidantes e alto potencial antidiabético exercido pelos componentes do óleo de copaíba (Ames-Siblin *et al.*, 2018; Bresciani *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2018).

A dose de óleo de copaíba e de milho foi escolhida com base no trabalho de Brito *et al.* (2000) em que foi padronizada a dose 0,63 ml/kg de peso de ratos *Wistar* de 120 a 150 dias de idade pesando 313 a 399 g. Neste estudo foi também utilizada a dose com o dobro do volume (1,26ml/kg), porém acarretou a morte de 90% dos animais. Assim, o volume de 0,63 ml/kg foi determinado pela ausência de mortalidade dos ratos pelo período de até 14 dias, o qual foi utilizado pelos autores para realização dos experimentos com óleo de copaíba. Desta forma, o presente trabalho considerou esta dosagem como referência.

A escolha da utilização do óleo de milho no pré-tratamento do grupo Controle foi feita baseada em estudos prévios (Brito, N. M. B. *et al.*, 2000, 2001; Brito, M. V. H. *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados da análise cromatográfica dos três diferentes óleos de copaíba estudados, os constituintes se assemelham aos perfis previamente identificados na literatura (Sousa *et al.*, 2011; Veiga Junior *et al.*, 2007), sendo o maior

constituente encontrado nas amostras adquiridas para os experimentos o beta-cariofileno. Este composto está associado à melhora do estado glicêmico ao impedir os danos inflamatórios e de estresse oxidativo avaliados em ratos diabéticos induzidos por STZ (Basha e Sankaranarayanan, 2016).

O óleo de milho foi adquirido comercialmente e é composto por ácidos graxos poliinsaturados, monoinsaturados e saturados, além de possuir viscosidade e densidade similar ao óleo de copaíba. Trabalhos recentes envolvendo o óleo de copaíba tem considerado o óleo de milho como controle para verificar se as modificações encontradas nos estudos seriam em decorrência dos princípios ativos do óleo de copaíba ou pela característica oleosa da substância. Com isso, justifica-se a mudança dos experimentos iniciais feitos com água para óleo de milho. Brito *et al.* (2014) analisaram o efeito do óleo de copaíba *Officinallis* na lesão hepática induzida por acetaminofeno em ratos Wistar utilizando óleo de milho como controle. Foi observada a atenuação da lesão hepática com o uso do óleo de copaíba, mas não foi observado nenhum efeito do óleo de milho, confirmando que esta substância padrão pode ser utilizada como controle para experimentos com óleo de copaíba.

Inicialmente avaliou-se o efeito dos diferentes óleos de copaíba na glicemia dos animais normais e diabéticos. Em todos os óleos de copaíba testados, verificou-se efeito hipoglicemiante nos animais normais. Por outro lado, em animais diabéticos, os diferentes óleos de copaíba foram capazes de aumentar a hiperglicemia basal, apesar de não alterar a cinética de decaimento da curva glicêmica em comparação com os tratados com óleo de milho. Estes resultados são bastante importantes visto que o óleo de copaíba é usado popularmente como possível tratamento do Diabetes. De fato, independente do óleo de copaíba, os resultados sugerem cuidado em indivíduos normais e em jejum pois podem agravar a hipoglicemia, porém no estado bem alimentado poderia ajudar no controle da glicemia. Entretanto, em indivíduos diabéticos, seu uso pode agravar a hiperglicemia ao invés de auxiliar no seu controle.

O comportamento hipoglicemiante parece estar relacionado aos sesquiterpenos presentes na composição dos óleos de copaíba, como verificado por Carvalho *et al.* (2018) com ratos diabéticos induzidos por STZ tratados com o óleo de copaíba Ducke. Foi observada ação antidiabética com diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, colesterol, triacilglicerol, creatinina, e ureia, além do aumento do número e do diâmetro das ilhotas de Langerhans, com consequente melhora nas complicações de DM.

Considerando o fígado como principal órgão atuante na manutenção da glicemia, sua função foi avaliada pela depuração de BSP e secreção de bile durante a perfusão. Os resultados desses dois indicadores demonstram que os óleos, na dosagem escolhida, não causaram alteração importante nestas funções, exceto o óleo de copaíba Langsdorffii que diminuiu a depuração do BSP. Esta alteração sugere que a metabolização de compostos deste óleo possa ocorrer pela via biliar, a qual o BSP também é.

A lesão hepatocelular e a preservação dos hepatócitos foram avaliados pelo nível das aminotransferases séricas (alanina- e a aspartato-aminotransferase), pois a ALT é encontrada principalmente no citoplasma dos hepatócitos e AST, na mitocôndria (Telli *et al.* 2016). Quando estão fora da faixa de normalidade, indicam a presença de lesões hepáticas. Os níveis de ALT e AST séricos dos grupos experimentais estudados foram abaixo de 150 U/L e sem diferenças entre os grupos, sugerindo que nem o modelo experimental de DM1 e nem os óleos de copaíbas utilizados no estudo foram capazes de provocar lesão hepática. O mesmo foi observado por Araújo-Jr *et al.* (2005), ao estudarem o efeito do óleo de copaíba em fígados de ratos submetidos a isquemia e reperfusão e não verificaram efeito hepatotóxico do óleo neste modelo avaliando apenas os níveis de ALT e AST. Brito *et al.* (2014) demonstraram efeito benéfico do óleo de copaíba em modelo experimental de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno, avaliado pelo nível de transaminases séricas. Entretanto, os possíveis efeitos citotóxicos do óleo de copaíba precisam ser mais estudados para melhor segurança de seu uso (Montes *et al.*, 2009).

Quando analisado o efeito do óleo de copaíba no metabolismo de glicose (glicogenólise ou gliconeogênese), diferenças entre os óleos estudados foram verificadas (Quadro 1). No estado bem alimentado, analisou-se a liberação de glicose decorrente da quebra do glicogênio, e no estado de jejum, decorrente da gliconeogênese induzida pela adição de lactato e piruvato ao líquido de perfusão de fígado. Verificou-se que os animais do grupo controle (citrato) tratados com água tiveram maior liberação de glicose pelo fígado perfundido no estado bem alimentado que no jejum. Nos animais diabéticos (STZ) houve menor liberação de glicose tanto no estado bem alimentado quanto no jejum em relação aos respectivos controles.

O pré-tratamento com óleo de milho que será usado como melhor controle dos experimentos não teve todos os grupos experimentais realizados em função da pandemia, assim como o pré-tratamento com o óleo de copaíba Ducke. Entretanto,

Quadro 1. Efeito dos diferentes óleos de copaíba no metabolismo de glicose em fígado de ratos normais e submetidos a modelos experimental de DM1.

Modelo experimental	Estado metabólico	Liberação de glicose				
		H ₂ O	Milho	Officinallis	Langsdorfii	Ducke
Normal	Bem alimentado	+++	++	++	++	++
	Jejum	++	nd	++	++	nd
DM1	Bem alimentado	++	nd	++	++	nd
	Jejum	+	nd	+	++	nd

Legenda: nd: não determinado.

Quadro 2. Efeito dos diferentes óleos de copaíba no conteúdo de glicogênio hepático de ratos normais e submetidos a modelos experimental de DM1.

Modelo experimental	Estado metabólico	Conteúdo de glicogênio hepático				
		H ₂ O	Milho	Officinallis	Langsdorfii	Ducke
Normal	Bem alimentado	nd	+++	+++	+++	+++
	Jejum	+	nd	++	+	nd
DM1	Bem alimentado	nd	nd	+	++	nd
	Jejum	+	nd	++	++	nd

Legenda: nd: não determinado.

verificou-se que nos animais normais (citrato) e no estado bem alimentado todos os óleos utilizados (milho e de copaíba) apresentaram níveis altos de liberação de glicose, mas ligeiramente mais baixos que aqueles com pré-tratamento com água. Nos animais STZ e bem alimentados pré-tratados com óleo de copaíba *Officinallis* ou *Langsdorffii*, não se verificou diferença com aqueles tratados com água. Assim, estes resultados sugerem que o óleo de copaíba não interfere na glicogenólise hepática.

No estado de jejum, verificou-se que o pré-tratamento com o óleo de copaíba *Officinallis* ou *Langsdorffii* nos animais normais não interfere na liberação de glicose. Entretanto, nos animais STZ e em jejum há menor liberação de glicose nos pré-tratados tanto com água como com óleo de copaíba *Officinallis*. Por outro lado, pré-tratamento com óleo de copaíba *Langsdorffii* promoveu aumento da liberação de glicose comparável ao respectivo grupo STZ-bem alimentado pré-tratado com *Langsdorffii* ou água. Estes resultados sugerem que o óleo de copaíba *Langsdorffii* ativa a gliconeogênese hepática, sendo um efeito maléfico em se tratando de indivíduos diabéticos que teriam como consequência maior contribuição para o aumento da glicemia.

Quando fomos analisar os conteúdos de glicogênio para comprovar o estado metabólico e avaliar o possível efeito dos óleos neste parâmetro (Quadro 2), pudemos verificar que no estado bem alimentado os animais Controle continham maior conteúdo de glicogênio independente do pré-tratamento quando comparados com os animais STZ. Entretanto, nos animais STZ pré-tratados com óleo de copaíba *Officinallis* ou *Langsdorffii* houve menor conteúdo de glicogênio hepático, porém com diferenças entre os tipos. Interessante que a liberação de glicose pelo fígado perfundido foi semelhante nestes dois óleos, enquanto o conteúdo de glicogênio no grupo *Officinallis* foi menor.

No estado de jejum, o tratamento com água não alterou o baixo nível de glicogênio nos animais normais ou STZ, sendo o mesmo observado nos animais controles tratados com *Langsdorffii*. Entretanto, o tratamento com *Langsdorffii* dos animais STZ e com *Officinallis*, tanto no controle quanto no STZ, levaram a conteúdo de glicogênio maiores que o respectivo controle (água), embora ainda considerados baixos e de acordo com o estado metabólico.

Considerando todos os dados em conjunto, sugere-se que tanto o óleo de copaíba *Officinallis* quanto o *Langsdorffii* alteram o metabolismo de glicose. Estes efeitos precisam ainda ser melhor caracterizados.

Em relação ao possível efeito destes óleos no estresse oxidativo, verifica-se que nos animais pré-tratados com *Officinallis* houve menor atividade da SOD no grupo controle em jejum e menor atividade da CAT em todos os grupos experimentais estudados. No jejum, houve menor atividade da CAT também nos animais pré-tratados com água. Assim, estes resultados preliminares indicam que o pré-tratamento com óleo de copaíba *Officinallis* diminui a capacidade antioxidante e com isso pode induzir alterações importantes no tecido hepático tanto em animais normais quanto diabéticos. Já o pré-tratamento com o óleo de copaíba *Langsdorffii*, apesar de também diminuir a atividade da CAT nos animais STZ, levou ao aumento da CAT nos animais normais em jejum. Glutationa peroxidase não teve diferença entre os grupos estudados.

Assim, o efeito dos diferentes tipos de óleo de copaíba no estresse oxidativo precisa ser melhor avaliado, mas os resultados preliminares não indicam correlação entre as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes estudadas pelos óleos de copaíba utilizados e alterações no metabolismo hepático de glicose e nem na geração de lesão hepatocelular (avaliada pelos níveis séricos de AST e ALT).

Em resumo, embora preliminares, os resultados sugerem atenção no uso indiscriminado do óleo de copaíba tanto em indivíduos normais quanto diabéticos, além da importância de saber o tipo de óleo a ser utilizado. Assim, a comprovação científica dos efeitos do óleo de copaíba e a identificação de diferenças de efeitos entre as diferentes espécies é de suma importância para proteger os usuários de possíveis efeitos deletérios ao organismo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que nos modelos experimentais utilizados, os óleos de copaíba estudados:

- não promoveram lesão hepatocelular, já que não causaram alteração dos níveis séricos de AST e ALT;

- tiveram efeito hipoglicemiante em animais normais e hiperglicemiante em animais diabéticos;

- alteram o metabolismo de glicose, seja a glicogenólise ou a gliconeogênese mas depende do tipo de óleo de copaíba. O óleo de copaíba *Langsdorffii* promoveu maior liberação de glicose nos animais diabéticos e em jejum; tanto o óleo de copaíba *Officinallis* quanto o *Langsdorffii* alteram o perfil de glicogênio hepático.

- alteram a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT dependendo do modelo experimental (controle ou STZ) ou do estado metabólico.

CONCLUSÃO GERAL FINAL:

Diferentes tipos de óleo de copaíba podem ter diferentes efeitos metabólicos que podem ser benéficos ou maléficos, sendo, portanto, importante identificar a espécie do óleo de copaíba e ter conhecimento de seus efeitos antes do uso indiscriminado.

REFERÊNCIAS

- ABUHASHISH, H.; AL-REJAIE, S. s; A AL-HOSAINI, K.; PARMAR, M.; AHMED, M. M. Alleviating effects of morin against experimentally-induced diabetic osteopenia. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, [S.l.], v. 5, n. 5, fev. 2013. Disponível em: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-5-5>. Acesso em: 07 jan. 2021.
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 121-126, 1984.
- AMES-SIBIN, A. P.; BARIZÃO, C. L.; CASTRO-GHIZONI, C. V.; SILVA, F. M. S.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C. A.; MARÇAL-NATALI, M. R.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 119, n. 12, p. 10262-10277, 21 ago. 2018. Acesso em: 23 jul. 2020.
- ARAÚJO JÚNIOR, F. A. de; BRAZ, M. N.; ROCHA NETO, O. G. da; COSTA, F. D'A.; 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 Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 93-99, fev. 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502005000100013. Acesso em: 19 dez. 2020.
- ATALAY, M.; LAAKSONEN, D. E. Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise. **J Sports Sci Med**. [S.l.], p. 1-14. mar. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957575/>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- AZEVEDO, G. S. de. O Aveso da costura: uma análise dos escritos de Gabriel Soares de Sousa (c.1540-1591). 2015. 258 f. Tese (Doutorado em História) – Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015. Acesso em: 2020-07-20.
- BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 245, p. 50-58, fev. 2016.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, [S.l.], v. 48, n. 1, p. 1-9, jan. 1999. Acesso em: 02 jul. 2020.
- BORGES, D. R.; KOUYOUMDJIAN, M. The recognition site for hepatic clearance of plasma kallikrein is on its heavy chain and is latent on prokallikrein. **Journal of Hepatology**. [S.l.], p. 115-121. set. 1992. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(05\)80103-5/pdf](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(05)80103-5/pdf). Acesso em: 07 jan. 2021.
- BRITO, M. V. H.; OLIVEIRA, R. V. B. de; SILVEIRA, E. L.; REIS, J. M. C. dos; NOGUCHI, A.; EPAMINONDAS, W. A.; MORAES, M. R. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 102-106, jun. 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000200005&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 jul. 2020.
- BRITO, M.V.H.; COSTA, F.D'A.; VASCONCELOS, D.M. de; COSTA, L.A.V.; YASOJIMA, E.Y.; TEIXEIRA, R.K.C.; YAMAKI, V.N. Attenuation of copaiba oil in hepatic damage in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 29, n. 12, p. 776-780, dez. 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502014001200776&script=sci_arttext&lng=en. Acesso em: 03 ago. 2020.
- BRITO, N. M. B. et al. Estudo ultraestrutural do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 00, Dec. 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010286502000000400003&lng=en&nrm=iso. Acesso em 04 mar. 2021.
- BRITO, N. M. B.; CARVALHO, R. de A.; LAMARÃO, L. G.; DAMOUS, S. H. B. Aspectos macroscópicos da vagina de ratas ooforectomizadas após aplicação tópica de óleo de copaíba. Fonte: *Rev. Para. Med = Rev. Para. Med. (Impr.)*, Belém, v. 3, n. 15, p. 13-17, jul./set. 2001.
- BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, [S.L.], v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 25 maio 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15919781/>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- CAMPOS-CARRARO, C.; TURCK, P.; LIMA-SEOLIN, B. G. de; TAVARES, A. M. V.; LACERDA, D. dos S.; CORSSAC, G. B.; TEIXEIRA, R. B.; HICKMANN, A.; LLESUY, S.; ARAUJO, A. S. da R.; BELLÓ-

Referências

- KLEIN, A. Copaiba Oil Attenuates Right Ventricular Remodeling by Decreasing Myocardial Apoptotic Signaling in Monocrotaline-Induced Rats. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 214-221, nov. 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/30212415>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- CARDOSO, P. C. dos S.; ROCHA, C. A. M. da; LEAL, M. F.; BAHIA, M. de O.; ALCÂNTARA, D. di F. Á.; SANTOS, R. A. dos; GONÇALVES, N. dos S.; AMBRÓSIO, S. R.; CAVALCANTI, B. C.; MOREIRA-NUNES, C. A. Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 89, p. 772-780, maio 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273639/>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- CARROLL NV, LONGLEY RW, ROE JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem**. 1956 Jun;220(2):583-93.
- CARVALHO, H. O.; SANTOS, I. V. F. dos; ROCHA, C. F. da; BARROS, A. S. A.; SOUZA, B. S. F. e; FERREIRA, I. M.; BEZERRA, R. M.; LIMA, C. S.; CASTRO, A. N.; CARVALHO, J. C. T. Effect of the treatment of *Copaifera duckei* oleoresin (copaiba) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 724-731, nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X17307135?via%3Dihub>. Acesso em: 02 fev. 2021.
- CAPUTO, L. S.; CAMPOS, M. I. C.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E.M.; FAJARDO, J. B.; VANELLI, C. P.; PRESTO, Á. C.D.; ALVES, M. S.; AARESTRUP, F. M.; PAULA, A. C. C.; FILHO, A. A. Da S.; AERESTRUP, B. J. V.; JUNIOR, O. S. P.; CORRÊA, J. O. do. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 80, p. 106177, mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007706/>. Acesso em: 16 dez. 2020.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**. [S.L.], p. 773-778. dez. 2000. Acesso em: 28 jul. 2020.
- CERUTTI, P.; GHOSH, R.; OYA, Y.; AMSTAD, P. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. **Environmental Health Perspective**, v. 102, p. 123-130, dez. 1994. Acesso em: 02 jul. 2020.
- CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences); ICLAS (The International Council for Laboratory Science). International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. dez. 2012.
- FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc39_2/04-QS-09-16.pdf. Acesso em: 23 jul. 2020.
- GALÚCIO, C. de S.; BENITES, C. I.; RODRIGUES, R. A. F.; MACIEL, M. R. W. SESQUITERPENES RECOVERY OF COPAIBA OIL-RESIN FROM MOLECULAR DISTILLATION. **Química Nova**, [S.L.], p. 795-800, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v39n7/0100-4042-qn-39-07-0795.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, [S.L.], v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 29 out. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996922/>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- HORÁCIO, B. O.; GERON, V. L. M. G.; FÁVERO, M. T.; SPERETTA, G.; MENEZES, M. F. Ação antiinflamatória do óleo de copaíba. **Revista Científica Faema**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 144-160, 9 jul. 2017. Disponível em: <http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/441>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. Bruxelas: International Diabetes Federation, 2019. 9 ed. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 04 jan. 2021.
- LENZEN, S.. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 216-226, 18 dez. 2007.
- LOURENÇO, A.C.s.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L.; SENSIAE, 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 Mediciniais**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 407-413, mar. 2009.

Referências

- Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400008&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 02 jul. 2020.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 429-438, maio 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v25n3/9337.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12616644/>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. de. O gênero *Copaifera* (Leguminosae - Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 455-476, jul. 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602008000300455&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 jul. 2020.
- MASSON, D. dos S. Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas. 2011. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. Acesso em: 2020-07-14.
- MEYER, J. A.; SPENCE, D. M. A perspective on the role of metals in diabetes: past findings and possible future directions. **Metallomics**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 32-41, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/metallomics/article/1/1/32/6040611?login=true>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- MIQUEL, J.; QUINTANILHA, A. T.; WEBER, H.. **CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**. v. 3. Florida: Crc Press Inc., 1989. 357 p.
- MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. s; SANT'ANNA, M. E. s; NEVES, V. M; SILVA, A. G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. *Natureza On Line, On Line*, v. 2, n. 7, p. 61-67, jan. 2009. Disponível em: <https://scinapse.io/papers/2337996821>. Acesso em: 19 dez. 2020.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal Of Biomedical Science**. [S.I.], p. 89-96. jun. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614697/>. Acesso em: 03 ago. 2020.
- 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 Medicinais**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 465-472, abr. 2009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400016&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 jul. 2020.
- RADENKOVI, C.M.; STOJANOVI, C. M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2015), doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.004.
- RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. de O. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: Embrapa Acre, 2004. 28 p. il. color. (Embrapa Acre. Documentos, 91). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAF-AC/10517/1/doc91.pdf> Acesso em: 23 jul. 2020.
- SANTANA, S. R.; BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; HURTADO, F. B.; OLIVEIRA, C. A. de; MELO, L. P. R.; SANTOS, G. J. dos. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. **Acta Agronômica**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 361-366, 4 ago. 2014. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122014000400008&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 jul. 2020.
- SANTOS, A. O. dos; 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 103, n. 3, p. 277-281, 30 abr. 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762008000300009. Acesso em: 14 jul. 2020.
- SOUSA, J. P. B.; BRANCALION, A. P.s.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C.C.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A.J.C.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 653-659, mar. 2011. Disponível em:

Referências

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510006011?via%3Dihub>. Acesso em: 19 dez. 2020.

TAKHTFOOLADI, H. A.; ASGHARI, A.; AMIRKAMALI, S.; HOSEINZADEH, H. A.; TAKHTFOOLADI, M. A. Evaluation of low-level laser therapy on skeletal muscle ischemia–reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats by assaying biochemical markers and histological changes. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 1211-1217, 1 jun. 2016. Acesso em: 02 jul. 2020.

TEIXEIRA, F. B.; SILVA, R. de B.; LAMEIRA, O. A.; WEBBER, L. P.; COUTO, R. S. D'A.; MARTINS, M. D.; LIMA, R. R. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1:313. 14 jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471965/>. Acesso em: 06 jul. 2020.

TELLI, E. M. P. R.; FRIGERI, M.; MELLO, S. R. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Rev. Bras. de Análises Clínicas**. v. 48, n. 3, p. 245-252, 2016. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/avaliacao-da-atividade-de-enzimas-hepaticas-em-dependentes-ex-dependentes-e-nao-usuarios-do-etanol-48n-3/>. Acesso em: 19 dez. 2020.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. CONTROLE DE AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA COMERCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 20, p. 612-615, 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v20n6/v20n6a07.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2020.

VEIGA, Valdir F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, Â. C.. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 476-480, set. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11536374/>. Acesso em: 14 jul. 2020.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 273-286, maio 2002. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000200016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 20 jul. 2020.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 519-528, jun. 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 jul. 2020.

VEIGA, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, Angelo C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 112, n. 2, p. 248-254, jun. 2007.

VINCENT, A. M.; KATO, K.; MCLEAN, L. L.; SOULES, M. E.; FELDMAN, E. L. Sensory Neurons and Schwann Cells Respond to Oxidative Stress by Increasing Antioxidant Defense Mechanisms. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 425-438, mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19072199/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146. jan./abr. 2012. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2082/1563>. Acesso em 08 ago. 2020.