

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Gabriela Becker

**OLEORRESINA DE COPAÍBA APRESENTA ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA TÓPICA EM UM MODELO DE QUEIMADURA  
DE PELE INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS  
2020

**Gabriela Becker**

**OLEORRESINA DE COPAÍBA APRESENTA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA  
TÓPICA EM UM MODELO DE QUEIMADURA DE PELE INDUZIDO POR  
RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS  
2020

Becker, Gabriela  
OLEORRESINA DE COPAÍBA APRESENTA ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA TÓPICA EM UM MODELO DE QUEIMADURA DE PELE  
INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS / Gabriela  
Becker.- 2020.  
81 p.; 30 cm

Orientadora: Sara Marchesan de Oliveira  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2020

1. Copaifera officinalis. 2. Dor. 3. Inflamação. 4.  
Nocicepção. 5. Queimadura solar. I. Marchesan de  
Oliveira, Sara II. Título.

**Gabriela Becker**

**OLEORRESINA DE COPAÍBA APRESENTA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA  
TÓPICA EM UM MODELO DE QUEIMADURA DE PELE INDUZIDO POR  
RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovado em 27 de novembro de 2020:**

*Sara Marchesan Oliveira*

---

**Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM) - Videoconferência**  
(Presidente/Orientador)

*Natália Brucker*

---

**Natália Brucker, Dra. (UFSM) - Videoconferência**

*Fernanda*

---

**Maria Fernanda de Paula Werner, Dra. (UFPR) - Videoconferência**

Santa Maria, RS  
2020

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me iluminar e me agraciar com sua infinita bondade, guiando meus caminhos sempre para que o melhor acontecesse.

Agradeço imensamente à minha família, meus pais Eloi e Dalva e minha irmã Carolina, pelo apoio incondicional, contribuindo para que todos os momentos difíceis se tornassem passageiros. Obrigada por serem minha fonte de carinho, simplicidade e leveza. Vocês são meus maiores incentivadores!

Agradeço à minha orientadora Sara Marchesan de Oliveira pela oportunidade desde à iniciação científica e por sempre estar disponível para ajudar e buscar o melhor. Pela compreensão e paciência, por todos os ensinamentos, além da excelente orientação e exemplo.

Às colegas do LabNeuro Indiara, Natháli, Camila, Evelyne e Maria Fernanda pela ótima convivência, pela amizade, parceria e espírito de união. Pelas sugestões, críticas, pelo apoio e ajuda incondicional que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, aqueles que caminham comigo e também aqueles que nem sempre podem estar por perto.

Agradeço a todos os professores que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Agradeço, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Enfim, minha eterna gratidão a todos que acompanharam ou de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, mas também para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

## RESUMO

### OLEORRESINA DE COPAÍBA APRESENTA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA TÓPICA EM UM MODELO DE QUEIMADURA DE PELE INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Gabriela Becker

ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

As lesões por queimaduras são comuns no mundo todo, representando um grande problema de saúde pública responsável por mais de 180 mil mortes anualmente. Essas lesões podem ser causadas por vários fatores, incluindo a radiação ultravioleta (UV). A exposição à radiação ultravioleta B (UVB) pode resultar em queimaduras solares, e conseqüentemente em uma resposta inflamatória que contribui para o desenvolvimento de dor, edema e eritema. Os tratamentos farmacológicos visam aliviar a dor e a inflamação, porém são pouco específicos para tratar queimaduras e estão associados a efeitos adversos que limitam seu uso. Diante disso, a busca por alternativas terapêuticas para o tratamento de queimaduras solares é necessária, e produtos de origem natural têm atraído a atenção de pesquisadores. A oleorresina de Copaíba, é amplamente utilizada na medicina popular como cicatrizante, antimicrobiana, analgésica e principalmente como anti-inflamatória. Desta forma, objetivamos avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação cutânea de uma formulação contendo oleorresina de Copaíba em um modelo de queimadura de pele induzido por radiação UVB em camundongos *Swiss* machos (25-30g). Primeiramente, foi analisada a composição química da oleorresina de Copaíba por cromatografia gasosa (CG-MS). Para o modelo de queimadura de pele, os camundongos foram anestesiados e apenas a pata traseira direita foi exposta uma única vez à radiação UVB durante 21 minutos (0,75 mJ/cm<sup>2</sup>). Os tratamentos foram aplicados topicamente (15 mg/pata) uma vez ao dia, durante seis dias, com o creme oleorresina de Copaíba (3%), creme sulfadiazina de prata (1%; controle positivo), ou creme base (veículo). O efeito antinociceptivo das formulações foi avaliado pela medida da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica, utilizando filamentos de von Frey e aparato de Hargreaves, respectivamente. A atividade anti-inflamatória foi determinada pela medida da espessura dérmica e infiltração de células inflamatórias, através da análise histológica. A caracterização das formulações também foi realizada. As formulações apresentaram valores de pH, fator de espalhabilidade, características macroscópicas e reológicas adequadas para aplicação cutânea. O creme oleorresina de Copaíba reduziu a alodinia mecânica induzida pela radiação UVB no 2º, 3º e 4º dia após a exposição à radiação UVB com uma inibição máxima ( $I_{máx}$ ) de  $64,6 \pm 7\%$  observada no 2º dia. A aplicação cutânea do creme oleorresina de Copaíba também reduziu a hiperalgesia térmica no 1º e 2º dia após a radiação UVB, com  $I_{máx}$  de 100% observada no 2º dia. Além disso, o creme oleorresina de Copaíba inibiu a infiltração de células inflamatórias, mas não reduziu o aumento da espessura dérmica induzida pela radiação UVB. Esses efeitos podem ser atribuídos, pelo menos em parte, à presença de componentes biológicos, como o  $\beta$ -cariofileno (60,17%) e outros sesquiterpenos identificados por CG-MS nesta oleorresina de Copaíba. Nossos resultados demonstram que a formulação contendo oleorresina de Copaíba apresentou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório em camundongos submetidos à radiação UVB, e a formulação creme apresentou características adequadas, garantindo sua qualidade e efeito terapêutico. Assim, aplicação cutânea do creme contendo oleorresina de Copaíba pode ser uma estratégia promissora tanto para o tratamento, como para terapia adjuvante da dor inflamatória associada a queimadura solar.

Palavras-chave: *Copaifera officinalis*. Dor. Inflamação. Nociceção. Queimadura solar.

## ABSTRACT

### COPAIBA OLEORESIN PRESENTS TOPICAL ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY IN A UVB RADIATION-INDUCED SKIN-BURN MODEL IN MICE

AUTHOR: Gabriela Becker

ADVISOR: Sara Marchesan de Oliveira

Burn injuries are common worldwide, representing a major public health problem responsible for more than 180,000 deaths annually. These injuries can be caused by several factors, including ultraviolet (UV) radiation. Ultraviolet B (UVB) radiation exposure can result in sunburn, and consequently, in an inflammatory response that contributes to the development of pain, edema and erythema. Pharmacological treatments aim for pain and inflammation relief, however, they are not specific to treat burns and are associated with adverse effects that limit their use. Therefore, the search for therapeutic alternatives for the treatment of sunburn is needed, and natural origin products have attracted the attention of researchers. Copaiba oleoresin is widely used in folk medicine as healing, analgesic, antimicrobial, and mainly as an anti-inflammatory. Thus, we aim to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory potential of the cutaneous application of a formulation containing Copaiba oleoresin in a skin-burn model induced by UVB radiation in male *Swiss* mice (25-30g). Firstly, the chemical composition of Copaiba's oleoresin was analyzed by gas chromatography (GC-MS). For the skin-burn model, the mice were anesthetized, and the right hind paw was exposed only once to UVB radiation for 21 minutes (0.75 mJ/cm<sup>2</sup>). The treatments were applied topically (15 mg/paw) once a day, for six days, with Copaiba oleoresin cream (3%), silver sulfadiazine cream (1%; positive control), or base cream (vehicle). The formulations' antinociceptive effect was evaluated by measurement of the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, using von Frey filaments and Hargreaves apparatus, respectively. The anti-inflammatory activity was determined by measuring the dermal thickness and inflammatory cells' infiltration through histological analysis. The formulation characterization was also carried. The formulations presented pH values, spreadability factor, macroscopic and rheological characteristics appropriate for cutaneous application. The Copaiba oleoresin cream reduced UVB radiation-induced mechanical allodynia on the 2nd, 3rd, and 4th day after UVB radiation exposure with a maximum inhibition (I<sub>max</sub>) of 64.6 ± 7% observed on the 2nd day. The cutaneous application of Copaiba oleoresin cream also reduced the thermal hyperalgesia on the 1st and 2nd days post UVB radiation, with an I<sub>max</sub> of 100% observed on the 2nd day. Moreover, the cutaneous application of Copaiba oleoresin cream inhibited the inflammatory cell infiltration but did not reduce the increase in the dermal thickness UVB-radiation induced. Such effects can be attributed, at least in part, to the presence of biological components, such as β-caryophyllene (60.17%) and other sesquiterpenes identified by GC-MS. Our results demonstrate that the formulation containing Copaiba oleoresin presented antinociceptives and anti-inflammatory effects in mice subjected to UVB radiation and that the cream formulation showed adequate characteristics, ensuring its quality and therapeutic effect. Thus, the cutaneous application of Copaiba oleoresin containing cream may be a promising strategy for treatment and adjuvant therapy for inflammatory pain associated with sunburn.

Keywords: *Copaifera officinalis*. Pain. Inflammation. Nociception. Sunburn.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das vias envolvidas com o processamento das informações nociceptivas.....	24
Figura 2 – Mecanismos da dor nociceptiva.....	28
Figura 3 – Mecanismos da dor inflamatória.....	32
Figura 4 – Radiação ultravioleta e a pele.....	39
Figura 5 – Queimadura solar e a resposta inflamatória.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMPA	Receptor glutamatérgico (do inglês <i><math>\alpha</math>-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isso xazol-propiónico</i> )
ATP	Trifosfato de Adenosina (do inglês <i>adenosine triphosphate</i> )
ASIC	Canais iônicos sensíveis a ácido (do inglês <i>acid-sensing ion channel</i> )
CID-11	11 <sup>th</sup> Edição da Classificação Internacional de Doenças (do inglês <i>International Classification of Disease 11th</i> )
CFA	Adjuvante completo de Freund (do inglês <i>Complete Freund's adjuvant</i> )
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês <i>calcitonin gene related peptid</i> )
DRG	Gânglio da raiz dorsal (do inglês <i>dorsal root ganglion</i> )
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Neurônios de faixa dinâmica ampla (do inglês <i>wide dynamic range - WDR</i> )
GPCR	Receptores acoplados à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled receptor</i> )
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês <i>International Association for the study of Pain</i> )
IB4	Isolectina B4
IL	Interleucina
Na <sub>v</sub>	Canais de sódio sensíveis à voltagem (do inglês <i>voltage-gated sodium channel</i> )
NE	Células nociceptivas específicas (do inglês, <i>nociceptive specific</i> )
NGF	Fator de crescimento do nervo (do inglês <i>nerve growth factor</i> )
NK1	Neurocinina 1 (do inglês <i>neurokinin 1</i> )
NMDA	N-metil-D-Aspartato (do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )
PAG	Substância cinzenta periaquedutal (do inglês <i>periaqueductal gray matter</i> )
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RVM	Medula rostroventromedial (do inglês <i>rostral ventromedial medulla</i> )
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>tumoral necrosis factor alpha</i> )
TrkA	Receptor de tirosina quinase de alta afinidade
TRP	Receptores de potencial transitório (do inglês <i>transient receptor potential</i> )
TRPA	Receptor de potencial transitório anquirina (do inglês <i>transient receptor potential ankyrin</i> )
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina (do inglês <i>transient receptor potential melastatin</i> )
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide (do inglês <i>transient receptor potential vanilloid</i> )
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
4.1 DOR E NOCICEPÇÃO.....	16
<b>4.1.1 Processamento das informações nociceptivas</b> .....	16
<b>4.1.2 Tipos de dor</b> .....	25
4.1.2.1 <i>Dor nociceptiva</i> .....	26
4.1.2.2 <i>Dor inflamatória</i> .....	29
4.1.2.3 <i>Dor neuropática</i> .....	33
4.1.2.4 <i>Dor disfuncional/nociplástica</i> .....	34
4.2 QUEIMADURAS.....	35
<b>4.2.1 Radiação Ultravioleta</b> .....	37
<b>4.2.2 Tratamentos para queimaduras</b> .....	44
4.3 PLANTAS MEDICINAIS.....	46
<b>4.3.1 Oleorresina de Copaíba</b> .....	50
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	55
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	79

## APRESENTAÇÃO

Nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA constam uma revisão da literatura sobre os temas abordados nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta dissertação estão apresentados no item ARTIGO CIENTÍFICO publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology*. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

O item CONCLUSÕES encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico contido neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e CONCLUSÕES desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no mesmo.

## 1 INTRODUÇÃO

A dor é uma das condições mais prevalentes que limitam a produtividade e diminuem a qualidade de vida dos pacientes (WILLIAMS; CRAIG, 2016). Nas queimaduras, a dor é o sintoma mais frequente e relevante, relatado desde o momento da lesão e até, ou além da fase de reabilitação (BOLUDA PÉREZ et al., 2016; SUMMER et al., 2007). Na fase aguda, a dor da queimadura é caracterizada por ser do tipo inflamatória, ou seja, dor que ocorre devido um dano tecidual e subsequente resposta inflamatória, sinalizando para o reparo do tecido danificado (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010). Contudo, o controle inadequado da dor aguda causada por queimaduras, contribui para a cronicidade do sintoma, como o desenvolvido na dor neuropática, prolongando o tempo de reabilitação do paciente o que resulta em altos custos com assistência médica (RICHARDSON; MUSTARD, 2009). Nestes casos, os pacientes tendem a sofrer não apenas com as complicações físicas da queimadura, como a experiência da dor, mas também com morbidades secundárias psicológicas e emocionais graves, em vista da hospitalização de longo prazo, lesões debilitantes como cicatrizes e deformidades que interferem diretamente na produtividade e qualidade de vida do paciente, resultando em altos impactos econômicos (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010; KADDOURA et al., 2017; MCINTYRE et al., 2016).

Assim, as lesões causadas por queimaduras representam uma grande preocupação de saúde pública mundial, pois estão associadas a taxas significativamente altas de morbidade e mortalidade (mais de 180 mil mortes por ano no mundo todo) (KOÇ; SAGLAM, 2012; MCINTYRE et al., 2016; WHO, 2018). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, cerca de um milhão de incidentes envolvendo queimaduras ocorrem a cada ano. Em relação as causas das lesões das queimaduras, estas podem ser fontes químicas ou elétricas, atrito, agentes térmicos como o frio e o contato direto com chama, superfície ou líquido quente, e também a radiação ultravioleta (UV) (CHURCH et al., 2006; JESCHKE et al., 2020; LOPES; MCMAHON, 2016).

A radiação UV proveniente da luz solar é um dos inúmeros fatores ambientais que atingem a pele, devido à sua localização anatômica no limite externo do corpo (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014). A energia da radiação UV possui efeitos biológicos importantes, no qual a radiação UVA (290 – 320 nm) e UVB (290–320 nm), apresentam maior relevância para a saúde humana (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; SCHUCH et al., 2013).

A radiação UVB como componente inerente da luz solar causa danos à pele, especialmente na epiderme e pode causar diferentes alterações, como aquelas das queimaduras solares, caracterizadas pelo desenvolvimento de edema, espessamento da epiderme, derme e estrato córneo e também pelo próprio eritema (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; LOPES; MCMAHON, 2016).

A resposta inflamatória observada após a exposição da pele à radiação UV, é o principal processo que ocorre nas queimaduras solares (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014). Este processo é gerado após o dano tecidual provocado pela queimadura, sendo instalado após a liberação de mediadores pró-inflamatórios de nociceptores ativados e por células inflamatórias residentes e recrutadas para o local da lesão (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; BASBAUM et al., 2009). Tais mediadores inflamatórios contribuem para o desenvolvimento de edema (inchaço) e eritema (vermelhidão) no local lesionado (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012).

Estes mediadores inflamatórios também contribuem para um aumento na sensibilidade dos nociceptores, desencadando a dor associada à queimadura solar, caracterizada por hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor) e alodinia (dor em resposta a um estímulo não nociceptivo) (BASBAUM et al., 2009; BISHOP et al., 2009).

O tratamento farmacológico das queimaduras é realizado principalmente como estratégia para reduzir a dor e a inflamação, porém são pouco específicos para tratar queimaduras (WANG et al., 2017). O agente antibacteriano sulfadiazina de prata tornou-se o tratamento padrão para queimaduras, embora, seu uso esteja associado com inúmeros efeitos adversos, como dermatite alérgica, eritema multiforme, pigmentação azul-acinzentada da pele, entre outros (ATIYEH et al., 2006; KHORASANI et al., 2009; MILLER et al., 2012). Além da sulfadiazina de prata, anti-inflamatórios não-esteroidais e corticoides também são utilizados para tratar queimaduras, no entanto, efeitos adversos limitam o seu uso à longo prazo (LOPES; MCMAHON, 2016; MCINTYRE et al., 2016). Assim, a busca de novos tratamentos, seguros e eficazes para o controle adequado da dor e inflamação causada por queimaduras é necessário, e produtos de origem natural utilizados na medicina popular, têm atraído a atenção de pesquisadores.

Um dos produtos amplamente utilizados na medicina popular, é a oleorresina de Copaíba, a qual é administrada por via oral ou através da aplicação tópica do óleo *in natura* ou em pomadas, para diversos fins terapêuticos, principalmente como anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (CARVALHO et al., 2005; LEANDRO et al., 2012; MACIEL et al., 2002; PAIVA et al., 2002a). A oleorresina de Copaíba é obtida a partir da exsudação do

tronco de várias espécies do gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinoideae), árvores nativas das regiões tropicais, amplamente distribuídas na América Latina (LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A composição fitoquímica da oleorresina de Copaíba consiste principalmente de diterpenos e sesquiterpenos (LEANDRO et al., 2012; VEIGA JR. et al., 2001). Sendo o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno, considerado o principal constituinte da oleorresina de algumas espécies de *Copaifera*, inclusive da *Copaifera officinalis*, e descrito como responsável por muitas das atividades farmacológicas desta oleorresina, principalmente aquelas que apresentam efeitos anti-inflamatórios (GOMES et al., 2007; JUNIOR et al., 2007; LEANDRO et al., 2012).

Atualmente, a oleorresina de Copaíba continua sendo utilizada na medicina popular, e estudos vêm demonstrando que estas oleorresinas obtidas de plantas do gênero *Copaifera*, incluindo aquela extraída da espécie *Copaifera officinalis*, apresentam propriedades farmacológicas, como antinociceptiva (GOMES et al., 2010, 2007; PADILHA et al., 2019), anti-inflamatória (GOMES et al., 2010; LUCCA et al., 2017, 2018; PAIVA et al., 2002b; VEIGA JR. et al., 2001), entre outras. Contudo, ainda não é conhecido o efeito da aplicação cutânea da oleorresina de Copaíba sobre a inflamação e a dor causadas pela queimadura de pele induzida pela radiação UVB.

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora as propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas da oleorresina de Copaíba já estejam bem estabelecidas para algumas espécies, outras espécies ainda carecem de estudos sobre suas atividades biológicas. Nesse sentido, entendendo que as queimaduras solares podem causar lesões caracterizadas principalmente pelo desconforto e alteração sensorial, em decorrência do processo inflamatório instalado, e que na maioria dos casos os tratamentos utilizados não fornecem controle suficiente da dor, objetivamos investigar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da oleorresina de Copaíba oriunda da espécie *Copaifera officinalis* em um modelo de queimadura de pele induzida pela radiação UVB em camundongos, ainda não avaliado em nenhuma espécie do gênero *Copaifera*. Esperamos que a oleorresina de Copaíba apresente resultados antinociceptivos e anti-inflamatórios promissores no modelo de queimadura induzido pela radiação UVB, a fim de que possamos contribuir para o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica para o tratamento das queimaduras, como aquelas causadas pela radiação solar.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação cutânea de uma formulação contendo oleorresina de Copaíba em um modelo de queimadura de pele induzido pela radiação ultravioleta B em camundongos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Investigar os constituintes da oleorresina de *Copaifera officinalis* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS).

3.2.2 Desenvolver uma formulação de uso tópico à base de creme Lanette contendo oleorresina de Copaíba e realizar a caracterização dessa formulação.

3.2.3 Investigar o possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação cutânea do creme contendo oleorresina de Copaíba em um modelo de queimadura induzido pela radiação ultravioleta B.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 DOR E NOCICEPÇÃO**

A dor é uma experiência complexa que envolve além da percepção de um estímulo aversivo, o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, sendo essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo (BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Segundo a definição estabelecida em 2020 pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020).

Embora, a dor seja um recurso fundamentalmente desagradável, ela contribui para uma função de proteção vital ao organismo, sinalizando possíveis danos potenciais (BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Contudo, a dor pode levar a efeitos indesejados, principalmente relacionados com a função e bem-estar social e psicológico, uma vez que é capaz de gerar angústia, aflição, decréscimo da produtividade no trabalho com consequente redução da qualidade de vida dos pacientes por ela acometidos (RAJA et al., 2020; WILLIAMS; CRAIG, 2016).

Entretanto, dor e nocicepção são fenômenos distintos. A dor não é apenas a atividade dos neurônios sensoriais, pois é uma condição também influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais (CARLINO; FRISALDI; BENEDETTI, 2014; RAJA et al., 2020; TRACEY; MANTYH, 2007). Assim, a dor é sempre uma experiência individual e subjetiva, onde os indivíduos aprendem a descrever o seu conceito por meio de suas experiências de vida (RAJA et al., 2020). Já a nocicepção, se refere apenas ao componente sensorial da dor, incluindo todos os processos de codificação e processamento de informações desencadeadas pelos estímulos nocivos, sendo possível de ser medida por parâmetros objetivos (LOESER; TREEDE, 2008; PRESCOTT; RATTÉ, 2017).

#### **4.1.1 Processamento das informações nociceptivas**

A experiência sensorial ou nocicepção se inicia na periferia, onde terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários, denominados de nociceptores, detectam estímulos potencialmente prejudiciais de origem mecânica, térmica ou química (TRACEY, 2017). Os nociceptores possuem quatro componentes funcionais, o terminal periférico que realiza a

transdução de estímulos externos e inicia os potenciais de ação, o axônio que conduz os potenciais de ação, o corpo celular que controla a identidade e a integridade do neurônio e o terminal central que forma o elemento pré-sináptico no sistema nervoso central (SNC) (WOOLF; MA, 2007).

Morfologicamente, as fibras aferentes primárias são neurônios de natureza pseudo-unipolar, o que significa que possuem um único axônio que se bifurca em dois ramos. Uma dessas projeções é longa e inerva os tecidos periféricos como a pele, mucosa e órgãos internos do corpo, onde recebe e reúne as informações relativas aos estímulos sensoriais. A segunda projeção é um ramo axonal que se direciona e conecta com a medula espinhal, transmitindo as informações detectadas na periferia aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (nervos espinhais) ou no tronco encefálico (nervos cranianos) (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014).

Os corpos celulares dos neurônios sensoriais primários que inervam grande parte do corpo, tronco e membros, encontram-se agrupados nos gânglios da raiz dorsal (DRG), localizados na coluna vertebral imediatamente lateral à medula espinhal, enquanto os corpos celulares que inervam a cabeça e a face, incluindo a boca, nariz e olhos, estão constituídos no gânglio trigeminal (JULIUS; BASBAUM, 2001; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014). Ainda, há o gânglio nodoso que abriga os corpos celulares das fibras aferentes vagais que inervam os órgãos da cavidade torácica, abdominal e pélvica (PAVLOV; TRACEY, 2017).

Os neurônios sensoriais primários são classicamente categorizados com base em uma série de critérios anatômicos, fisiológicos e bioquímicos (GOLD; GEBHART, 2010). Desta forma, as principais fibras aferentes primárias estão subclassificadas em fibras A $\beta$ , A $\delta$  e fibras C. Corpos celulares de grande diâmetro e axônios altamente mielinizados descrevem as fibras A $\beta$ , e por essas características são as fibras que apresentam uma velocidade de condução muito rápida (30-70 m/s) do estímulo sensorial. As fibras A $\beta$  têm baixos limiares de ativação, portanto, respondem a estímulos não nocivos, como um toque leve, sendo responsáveis por transmitir a informação tátil. Além disso, as fibras A $\beta$  também estão envolvidas com a localização e postura do corpo no espaço, fenômeno denominado de propriocepção (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014). Embora, as fibras A $\beta$  não estejam envolvidas com o processamento nociceptivo em estados fisiológicos, após uma lesão nervosa, como em casos de dor neuropática, elas são capazes de transmitir impulsos nervosos nociceptivos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

As fibras aferentes primárias A $\delta$  e C, que estão envolvidas na resposta a estímulos nocivos são denominadas de nociceptores ou “fibras da dor” (D’MELLO; DICKENSON,

2008). As fibras A $\delta$  apresentam corpos celulares de diâmetro médio, no qual os aferentes são levemente mielinizados, conduzindo o estímulo nocivo com uma velocidade de condução rápida (12-30 m/s). Estas fibras estão subdivididas em duas classes principais, as fibras A $\delta$  do tipo I e do tipo II. As fibras A $\delta$  do tipo I respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas possuem um alto limiar de detecção para o calor (> 50°C). Portanto, elas estão associadas com a primeira dor ou dor aguda aos estímulos mecânicos, como uma picada de alfinete. Já, as fibras A $\delta$  do tipo II possuem um baixo limiar para a detecção do calor e um alto limiar para a detecção de estímulos mecânicos, estando envolvidas com as respostas agudas da dor ao calor (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Já a segunda classe de nociceptores, as fibras nociceptivas do tipo C, apresentam um pequeno diâmetro e não são mielinizadas. Como a mielinização aumenta a velocidade de condução do potencial de ação, as fibras C são caracterizadas por uma velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s), conferindo a transmissão da dor lenta e mal localizada, o que popularmente identificamos como dor latejante. As fibras C detectam seletivamente estímulos nociceptivos ou dolorosos por possuírem alto limiar de ativação (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; D'MELLO; DICKENSON, 2008). Além disso, com base nas substâncias neuroquímicas que as fibras C expressam, elas podem ser classificadas como fibras peptidérgicas e não peptidérgicas. As fibras C peptidérgicas produzem e liberam a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e expressam o receptor de tirosina quinase de alta afinidade (TrkA) para o fator de crescimento do nervo (NGF). Por outro lado, as fibras C não peptidérgicas são identificadas por sua ligação à isolectina B4 (IB4) e por expressarem o receptor purinérgico P2X3 e o receptor c-Ret, alvo da família de fatores neurotróficos derivados de células gliais (BASBAUM et al., 2009; GOLD; GEBHART, 2010).

Além das diferenças anatômicas, bioquímicas e fisiológicas, os nociceptores também são funcionalmente heterogêneos. Os nociceptores expressam de forma heterogênea vários transdutores de estímulos nocivos, determinando a capacidade de detectarem uma ou mais modalidades de estímulos. Assim, alguns nociceptores respondem apenas para um único tipo de estímulo, enquanto outros são igualmente responsivos e capazes de detectar estímulos mecânicos, físicos e químicos, sendo denominados como nociceptores polimodais (BASBAUM et al., 2009; BENNETT; WOODS, 2014; GOLD; GEBHART, 2010).

Para que os sinais nociceptivos sejam transmitidos da periferia até o SNC inicialmente a presença destes estímulos nocivos deve ser detectada, processo conhecido como transdução sensorial, no qual a energia do estímulo é convertida em correntes iônicas (GRACE et al., 2014;

TRACEY, 2017). A transdução dos estímulos nocivos externos ocorre por meio da ativação de receptores ou canais iônicos específicos (denominados de transdutores) expressos nas terminações nervosas dos nociceptores (BENARROCH, 2015; GRACE et al., 2014; TALBOT; FOSTER; WOOLF, 2016). Os neurônios sensoriais também expressam um repertório de canais de sódio sensíveis à voltagem ( $Na_v$ ), em que  $Na_v1.7$ ,  $1.8$  e  $1.9$ , são determinantes para a excitabilidade do nociceptor, sendo críticos para a iniciação dos potenciais de ação nos terminais periféricos dos nociceptores e para a condução ao longo do axônio até a medula espinhal. Diferentes tipos de canais de potássio também estão expressos nos nociceptores, os quais são essenciais para a modulação, principalmente redução da excitabilidade dos nociceptores (BASBAUM et al., 2009; BENARROCH, 2015; BINGHAM et al., 2009). Em conjunto, os canais expressos nas terminações nervosas livres dos neurônios aferentes primários (nociceptores) são responsáveis pelas propriedades básicas dos nociceptores, incluindo o alto limiar de ativação e a ausência de atividade espontânea (BENARROCH, 2015).

A condução das informações sensoriais ocorre a jusante da transdução de sinal, na forma de potenciais de ação que são conduzidos ao longo dos axônios das fibras aferentes primárias até o corno dorsal da medula espinhal (TRACEY, 2017). O corno dorsal da medula espinhal é organizado em diferentes lâminas (I-X) que se estendem da região mais superficial à região mais profunda (D'MELLO; DICKENSON, 2008). O padrão de distribuição das terminações nervosas centrais das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal é determinado pela função ou modalidade sensorial detectada (TODD, 2010). A maioria das fibras nociceptivas A $\delta$  e C tem suas terminações nas lâminas I e II (também conhecida como zona marginal e substância gelatinosa, respectivamente), que constituem as lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal. Estas fibras podem ainda atingir as lâminas mais profundas, mas em menor número. Por outro lado, as fibras A $\beta$ , inervam predominantemente as lâminas profundas III, IV e V (D'MELLO; DICKENSON, 2008; TODD, 2010).

Na medula espinhal são encontrados diferentes tipos de células que fazem conexões com os aferentes primários. As células nociceptivas específicas (NE), encontradas principalmente superficialmente fazem sinapses com as fibras A $\delta$  e C, disparando potenciais de ação quando um estímulo doloroso é detectado na periferia. Enquanto que as células que recebem entrada exclusivamente a partir de fibras A $\beta$  respondem apenas ao toque. Por fim, existe ainda um terceiro tipo de neurônio, localizado mais profundamente (lâmina V) e identificado por receber informações de todos os três tipos de fibras sensoriais, respondendo a uma ampla gama de estímulos tanto nocivos como não-nocivos. Por essas características, estes

neurônios são denominados de neurônios de faixa dinâmica ampla (FDA) (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008).

No corno dorsal da medula espinhal existem também interneurônios, axônios que se arborizam e permanecem na medula espinhal sendo encontrados em sua grande maioria nas lâminas I, II e III (TODD, 2010). Estes interneurônios podem ser divididos em duas classes principais: excitatórios, que liberam o neurotransmissor glutamato, e inibitórios que liberam os neurotransmissores GABA e glicina. Os interneurônios inibitórios e excitatórios podem modular a informação nociceptiva nas células NE e nos neurônios de FDA antes de sua retransmissão para os centros supra-espinhais, sendo o equilíbrio crucial para a função normal do sistema nociceptivo (D'MELLO; DICKENSON, 2008; TODD, 2010). Além disso, células não neuronais situadas na medula espinhal, incluindo astrócito e microglia, também são capazes de influenciar na transmissão de estímulos nocivos, sobretudo em condições dolorosas (D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER, 2010).

Os sinais nociceptivos (térmicos, mecânicos ou químicos) são convertidos em correntes iônicas e assim conduzidos na forma de potenciais de ação, do local do estímulo na periferia até o corno dorsal da medula espinhal. Assim, quando o potencial de ação alcançar os terminais pré-sinápticos centrais na medula espinhal, a transmissão ocorre em resposta a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem com conseqüente influxo de cálcio e liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente glutamato (BASBAUM et al., 2009; GRACE et al., 2014).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório em todo o sistema nervoso, sendo utilizado pela grande maioria das fibras aferentes primárias (KUNER, 2010; TODD, 2010). O glutamato liberado do neurônio pré-sináptico exerce seus efeitos nos receptores ionotrópicos  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), bem como sobre os receptores metabotrópicos acoplados à proteína G expressos nos neurônios pós-sinápticos. A ação do glutamato nos receptores AMPA produz potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos que define a resposta basal inicial dos neurônios tanto aos estímulos táteis quanto nocivos. Além da liberação de glutamato, a ativação intensa ou sustentada das fibras C promove a liberação de neuropeptídeos, SP e CGRP, na fenda sináptica. Estes neuropeptídeos ao ligarem aos seus respectivos receptores de neurocinina 1 (NK1) e receptor de calcitonina 1 e 2 (CGRP-1 e CGRP-2), produzem potenciais sinápticos lentos, contribuindo para a plasticidade funcional na transmissão da dor (BINGHAM et al., 2009; KUNER, 2010).

As aferências centrais das fibras aferentes primárias realizam sinapses com interneurônios e neurônios de projeção nociceptiva (neurônios de segunda ordem), no corno dorsal da medula espinhal (GRACE et al., 2014; TODD, 2010). Sinapses com interneurônios espinhais assim que os potenciais de ação alcançam a medula espinhal podem por exemplo, levar a ativação de neurônios motores (fibras eferentes). Estes neurônios motores conduzirão a informação do SNC para a periferia, contribuindo para o rápido reflexo de retirada da parte do corpo em contato com o estímulo (VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014).

Quanto as sinapses com os neurônios de segunda ordem, estas ocorrem após o processamento das informações nociceptivas na medula espinhal por circuitos complexos envolvendo interneurônios excitatórios e inibitórios. Os neurônios de segunda ordem ou de projeção por sua vez transmitem o sinal nociceptivo da medula espinhal até os centros superiores, através de duas vias ascendentes (BASBAUM et al., 2009; KUNER; FLOR, 2017; TODD, 2010). Uma das vias pelas quais a informação nociceptiva pode ascender é a via espinotâlamica. Nesta via, as projeções ascendem de um grande número de neurônios encontrados mais profundamente na lâmina III-VI do corno dorsal da medula espinhal até o tálamo, de onde neurônios de terceira ordem projetam-se até o córtex somatossensorial (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008). Em vista das projeções que o estímulo alcança através desta via, descreve-se que a via espinotâlamica é responsável por detectar o componente discriminativo-sensorial da dor. No córtex somatossensorial primário é determinada a localização e intensidade do estímulo nocivo, enquanto o tipo do estímulo (por exemplo, térmico ou mecânico) e outros aspectos cognitivos da percepção da dor são determinados no córtex somatossensorial secundário (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009).

Outra via pelas quais as informações do corno dorsal da medula espinhal ascendem aos centros superiores no encéfalo, é a via espinoparabraquial amigdalóide. As projeções ou neurônios de segunda ordem desta via partem principalmente da lâmina I na medula espinhal para o núcleo parabraquial localizado na ponte (tronco encefálico), e através de neurônios de terceira ordem ascendem até a amígdala que converge para o córtex insular e córtex cingulado, regiões relacionadas à dimensão do componente afetivo-emocional da experiência dolorosa (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008). As sensações como o desprazer e o sofrimento associados à dor, são reconhecidos pelo córtex cingulado anterior, enquanto, o córtex insular está envolvido na aversão emocional e na reação autonômica ao estímulo que evoca a dor (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrada a ativação de áreas corticais pré-frontais, associadas com experiências de medo e

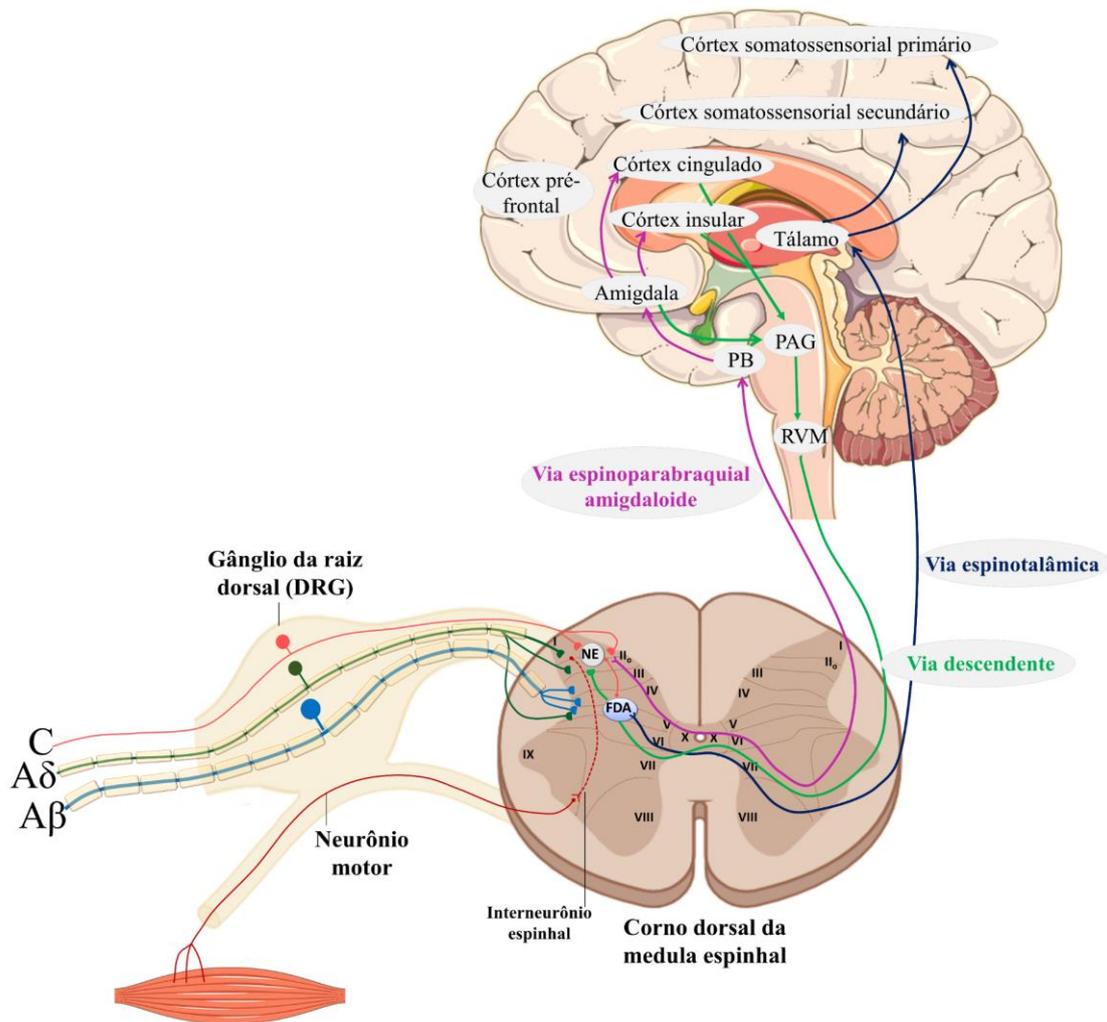
depressão durante a experiência dolorosa, bem como regiões geralmente não associadas ao processamento da dor (como gânglios da base e cerebelo) (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009).

Logo, nenhuma região específica do cérebro é essencial para a dor, mas a dor resulta da ativação de um grupo de estruturas corticais que podem ou não estar sendo ativadas durante a experiência dolorosa (BINGHAM et al., 2009; GRACE et al., 2014). Essas regiões constituem o que é comumente referido como "matriz da dor" (TRACEY; MANTYH, 2007). Além destas áreas supra-espinhais desempenharem atividades importantes para a interpretação da informação nociva ascendente, várias estruturas também contribuem para a modulação dos circuitos descendentes da dor (GRACE et al., 2014).

A via descendente da dor origina-se no tronco encefálico, e é transmitida por meio da substância cinzenta periaquedutal (PAG) localizada no mesencéfalo, ao corno dorsal da medula espinhal. A PAG integra a entrada de múltiplas áreas corticais que recebem os estímulos nociceptivos ascendentes, incluindo o córtex somatossensorial, córtex pré-frontal, córtex insular, córtex cingulado anterior, amígdala, hipotálamo e núcleos do tronco encefálico (BINGHAM et al., 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). A PAG realiza conexões com a medula rostroventromedial (RVM), localizada na parte inferior do tronco encefálico, considerada o transmissor final da via descendente, uma vez que ela irá projetar-se diretamente para o corno dorsal da medula espinhal (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014)

As vias descendentes das estruturas do tronco cerebral são capazes de influenciar a sinalização nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. Essas influências descendentes são de natureza facilitatória ou inibitória (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Estes efeitos facilitatórios ou inibitórios podem ser mediados por dois tipos de neurônios existentes na RVM, os quais projetam-se amplamente da RVM até o corno dorsal da medula espinhal, especificamente para as lâminas I, II e V. Como resultado esses neurônios são capazes de provocar uma modulação descendente bidirecional da dor, onde podem facilitar ou inibir a entrada nociceptiva na medula espinhal. Esses efeitos são mediados por um grupo de células denominadas de ON (liga) e células OFF (desliga). Quando ativas as células ON são capazes de facilitar a transmissão nociceptiva, aumentando o seu disparo em resposta a um estímulo nocivo, e assim causando a hiperalgesia. Por outro lado, as células OFF quando ativas são capazes de inibir a transmissão nociceptiva, e assim produzir um efeito antinociceptivo (FIELDS; MALICK; BURSTEIN, 1995; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Ainda, entre as várias populações de axônios que se projetam do encéfalo para a medula espinhal, encontram-se os neurônios monoaminérgicos, que incluem neurônios positivos para serotonina, noradrenalina e dopamina. Estes também exercem efeitos modulatórios da dor, podendo inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva ao nível do corno dorsal da medula espinhal, através da ativação de diferentes subtipos de receptores localizados nos aferentes nociceptivos primários, nos neurônios de projeção do corno dorsal, em interneurônios excitatórios ou em inibitórios locais (BENARROCH, 2008; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Portanto, devido a importância das vias descendentes de neurônios positivos para monoaminas e para as células ON e OFF em modularem a transmissão nociceptiva, evidências clínicas apontam que disfunções nestas vias podem resultar de inibição reduzida e/ou facilitação aumentada das respostas nociceptivas. Em consequência tais disfunções podem alterar a resposta nociceptiva frente a um estímulo nocivo periférico, levando ao aumento da dor observado em muitas condições dolorosas crônicas (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).



**Figura 1- Representação das vias envolvidas com o processamento das informações nociceptivas:** Os estímulos sensoriais são transmitidos a partir da periferia por meio de neurônios sensoriais aferentes primários (fibras C, A $\delta$  e A $\beta$ ) até o corno dorsal da medula espinhal. As fibras A $\beta$  detectam estímulos inócuos e alvejam as lâminas III-V. Já as fibras A $\delta$  e C detectam estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) e seus terminais centrais terminam principalmente nas lâminas superficiais (I-II) e também em lâminas profundas. Nas lâminas superficiais também são encontradas as células nociceptivas específicas (NE) que são capazes de fazer sinapses com as fibras A $\delta$  e C; enquanto nas lâminas profundas (IV-V) encontram-se os neurônios de faixa dinâmica ampla (FDA) que recebem informações dos três tipos de fibras. As fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal que enviam as informações sensoriais para regiões supra-espinhais por meio de duas vias ascendentes. Os neurônios da via espinotalâmica (em azul) se projetam das lâminas III-VI até o tálamo, onde neurônios de terceira ordem alcançam o córtex somatossensorial primário e secundário determinando o componente sensorial-discriminativo da dor. Os neurônios da via espinoparabraquial amigdalóide (em lilás) partem principalmente das lâminas mais superficiais da medula espinhal até o núcleo parabraquial (PB) de onde partem projeções para a amígdala, e desta para o córtex insular e cingulado os quais são responsáveis pelo componente afetivo-emocional da dor. Vias descendentes da dor (em verde) projetam-se de áreas encefálicas (amígdala, córtex cingulado, córtex insular) para áreas do tronco encefálico como

a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula rostral ventromedial (RVM), que ao serem ativadas são capazes de modular o processamento espinhal da dor. As fibras A $\delta$  e C além de orientarem duas vias ascendentes, também fazem sinapses com interneurônios espinhais (em vermelho) que ativam neurônios motores, conduzindo a informação até o tecido muscular, na periferia, sinalizando para a rápida retirada da parte do corpo em contato com o estímulo nocivo. Adaptado de D'Mello e Dickenson (2008), Basbaum et al. (2009), Bingham et al. (2009) e Vriens, Nilius e Voets (2014).

#### **4.1.2 Tipos de dor**

Em relação ao tempo de duração, a dor pode ser classificada em dor aguda ou dor crônica. A dor aguda é uma forma de dor transitória, que apresenta uma causa identificável, iniciada como resposta de uma lesão ou iminência de lesão tecidual, sendo restrita ao local da lesão e solucionada após a resolução do dano (KUNER, 2010; KUNER; FLOR, 2017). Essa dor tem significado biológico importante na proteção do tecido lesionado (JI et al., 2018). Ao contrário, a dor crônica é uma dor que persiste por longos períodos de tempo, se estendendo além do tempo normal de cura do insulto ou lesão original e pode não ter uma causa claramente identificável (KUNER, 2010; KUNER; FLOR, 2017). Segundo a nova edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-11), que foi adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2019, a dor crônica é definida como a dor que persiste ou recorre por mais de 3 meses. Sendo que nas síndromes de dor crônica, a dor pode ser a única ou a principal queixa que requer tratamento e cuidados especiais (TREEDE et al., 2019).

A dor crônica é patológica, maladaptativa e não tem função biológica benéfica (KUNER, 2010; MATSUDA; HUH; JI, 2019). No entanto, as razões pelas quais a dor aguda em alguns indivíduos, pode se tornar um estado crônico ainda é mal compreendido (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Em geral, acredita-se que a plasticidade neuronal nas vias e circuitos de codificação da dor contribua para o desenvolvimento da dor crônica (JI et al., 2018; KUNER; FLOR, 2017).

De forma geral, o termo dor crônica é empregado para definir várias condições, cuja característica comum é a presença de dor persistente (TREEDE et al., 2019). A dor crônica é um grande problema de saúde à nível mundial (MATSUDA; HUH; JI, 2019), uma vez que é uma importante fonte de sofrimento, que interfere nas funções diárias dos pacientes, e assim impacta negativamente na qualidade de vida (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014; TREEDE et al., 2019). Além disso, a dor crônica pode estar associada com prejuízos afetivos e cognitivos, tais como ansiedade, depressão, anedonia e déficits de aprendizagem (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Consequentemente, a dor crônica é uma condição que

acarreta em altos custos socioeconômicos, e apesar dos altos custos as opções terapêuticas atualmente disponíveis ainda fornecem um controle inadequado da dor, sendo bem sucedidas em apenas 30% dos casos (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).

Com base nas diferenças mecanicistas a dor pode ser distinguida em três tipos: dor nociceptiva, dor inflamatória (como a proporcionada pela queimadura solar) e dor neuropática (BASBAUM et al., 2009).

#### *4.1.2.1 Dor nociceptiva*

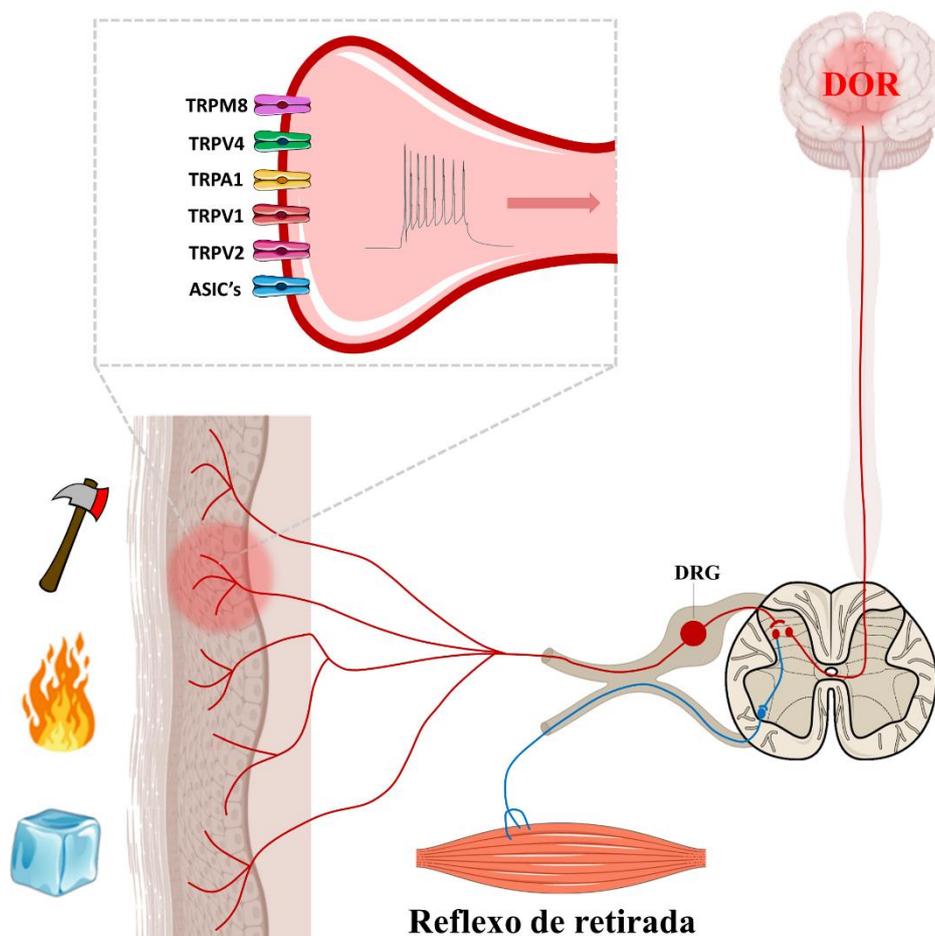
A dor nociceptiva é um dos sistemas de defesa adquirido pelos humanos e outros organismos ao longo da sua evolução, com a função fundamental de respostas rápidas frente a uma ampla gama de estímulos que possam ameaçar a homeostase do organismo (INOUE; TSUDA, 2018). Em outras palavras, a dor nociceptiva reflete nossa capacidade de detectar a presença de estímulos potencialmente prejudiciais, e seguida da sensação dolorosa, apresentar o reflexo de retirada, minimizando o contato com o estímulo (INOUE; TSUDA, 2018; WOOLF, 2010). Desta forma, a dor nociceptiva exerce uma atividade fisiológica de proteção e alerta frente a circunstâncias que podem causar algum dano potencial aos tecidos, além de definir o que devemos evitar no futuro (PRESCOTT; RATTÉ, 2017; WOOLF, 2010).

Para que a dor nociceptiva cumpra sua função protetora, a sensação deve ser tão desagradável a ponto de não ser ignorada (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Logo, a dor é iniciada em resposta a estímulos nocivos intensos, capazes de ativarem os neurônios nociceptivos de alto limiar, fibras A $\delta$  e C, e persiste apenas na presença mantida destes estímulos (GRACE et al., 2014; WOOLF; MA, 2007). De forma geral, é a dor que sentimos ao tocar em algo muito frio ou quente, ou em objetos pontiagudos e cortantes (WOOLF, 2010). Ainda, a dor nociceptiva serve como um importante alerta de patologias internas, como na isquemia cardíaca e em casos de um apêndice rompido (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; PRESCOTT; RATTÉ, 2017).

Para que os neurônios nociceptivos transmitam o impulso nervoso da periferia ao SNC, os estímulos nocivos potencialmente danosos ativam receptores ou canais iônicos específicos expressos nas terminações nervosas dos nociceptores (TALBOT; FOSTER; WOOLF, 2016). Entre os transdutores de calor, frio e estímulos mecânicos ou químicos, estão os receptores de potencial transitório (TRPs) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC). Por exemplo, as fibras nociceptivas sensíveis ao calor nocivo expressam principalmente o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), o qual também responde a estímulos mecânicos e químicos. Além disso, o calor pode também ativar fibras nociceptivas que expressam outros membros da

família do TRPV, como o TRPV2, TRPV3 e TRPV4 e ainda o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) e o receptor de potencial transitório melastatina 3 (TRPM3) (TRACEY, 2017; VANDEWAUW et al., 2018; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014). Já, a maioria das fibras nociceptivas sensíveis ao frio expressa o canal TRPM8, assim como TRPA1 que também pode mediar parte da sensação ao frio nocivo (BASBAUM et al., 2009; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014). Por fim, os canais ASIC 1, 2 e 3, além de serem canais sensíveis a mudanças químicas, como a presença de ácido, também foram propostos como canais de mecanotransdução, assim como TRPA1 e TRPV1 também podem ser sensíveis frente a estes estímulos (BASBAUM et al., 2009).

Após os estímulos serem detectados periféricamente pelos receptores ou canais iônicos específicos, eles são transduzidos em atividade elétrica nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais primários de alto limiar, e por meio de potenciais de ação a informação nociceptiva é conduzida ao longo do axônio até a medula espinhal. Posteriormente, a informação nociceptiva ascende até regiões corticais, onde é processada como um sinal doloroso (BINGHAM et al., 2009; WOOLF; MA, 2007). Ainda, na medula espinhal os neurônios sensoriais primários ativam via interneurônios espinhais os neurônios motores, resultando em um rápido reflexo espinhal de retirada da parte do corpo em contato com o estímulo nocivo (VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014).



**Figura 2 – Mecanismos da dor nociceptiva:** O reconhecimento de estímulos potencialmente prejudiciais (mecânicos, térmicos ou químicos) ocorre por meio de receptores ou canais iônicos específicos localizados na periferia das fibras sensoriais primárias. A informação nociceptiva é reconhecida e conduzida até a medula espinhal, e desta até regiões corticais, onde a informação nociceptiva é processada como um sinal doloroso. A ativação de neurônios motores, por meio de interneurônios espinhais, conduz a informação até o tecido muscular, na periferia, sinalizando para a rápida retirada da parte do corpo em contato com o estímulo nocivo. Adaptado de Scholz e Woolf (2002) e Vriens, Nilius e Voets (2014).

Devido à importância da dor nociceptiva como um sistema de alerta e defesa do organismo, a ausência dessa função adaptativa como na insensibilidade congênita a dor, pode trazer danos graves ao indivíduo (WOOLF, 2019). A insensibilidade congênita a dor é uma doença hereditária, que ocorre devido a mutações que inativam o gene *SCN9A* responsável por codificar o canal de sódio sensível a voltagem  $Na_v1.7$ . Com a mutação no gene, a proteína  $Na_v1.7$  traduzida é não funcional (BENNETT; WOODS, 2014). Nessa condição, nenhuma dor é sentida em qualquer parte do corpo, seja por um estímulo nocivo mecânico, térmico ou químico, resultando em automutilações, fraturas ósseas, amputações, deformidades articulares e morte precoce (BENNETT; WOODS, 2014; BINGHAM et al., 2009). Essa doença hereditária

demonstra a importância da dor nociceptiva. Além disso, evidencia a função crítica dos canais de sódio  $Na_v1.7$  funcionais nos nociceptores para a regulação da excitabilidade (BENNETT; WOODS, 2014; MCDERMOTT et al., 2019).

#### 4.1.2.2 *Dor inflamatória*

Em resposta aos danos teciduais causados por lesões ou infecções ocorre o estabelecimento de um processo inflamatório a fim de promover o reparo do tecido danificado. Normalmente, a resposta inflamatória está acompanhada da percepção dolorosa, sendo assim denominada de dor inflamatória (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; MATSUDA; HUH; JI, 2019). O desenvolvimento da dor inflamatória ocorre como uma resposta normal do organismo e possui um importante papel protetor e adaptativo (BINGHAM et al., 2009; GRACE et al., 2014; WOOLF, 2010). Neste caso, a dor não atua como um sinal de alerta protegendo o organismo contra um estímulo nocivo, mas sim, passa a agir sobre as consequências do dano, desencorajando atividades do indivíduo de forma que ele evite o uso da parte do corpo afetada, reduzindo o risco adicional de danos, assim auxiliando no reparo adequado do tecido lesionado (MATSUDA; HUH; JI, 2019; PRESCOTT; RATTÉ, 2017). Um exemplo, é a importância da dor que ocorre após uma cirurgia, considerando que caso essa dor não estivesse presente logo após o procedimento cirúrgico e os pacientes realizassem suas funções normalmente, a cicatrização da ferida cirúrgica poderia ser prejudicada (WOOLF, 2019).

Após a ocorrência de uma lesão tecidual existe uma complexa interação nas respostas biológicas observadas entre o sistema imunológico, somatossensorial, autônomo e vascular (JI et al., 2018; MATSUDA; HUH; JI, 2019). Acompanhado ao dano tecidual ocorre o extravasamento plasmático e o recrutamento de células imunes para o local da lesão, como macrófagos e neutrófilos. As células imunes infiltradas e as células residentes, incluindo mastócitos, basófilos, macrófagos, monócitos, neutrófilos, queratinócitos e fibroblastos secretam inúmeros mediadores inflamatórios, como bradicinina, eicosanoides e lipídios relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e endocanabinoides), neurotrofinas, fator de crescimento do nervo (NGF), aminas (serotonina e histamina), SP, CGRP, trifosfato de adenosina (ATP), citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, gerando a “sopa inflamatória” (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; BASBAUM et al., 2009; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Os neurônios sensoriais não respondem apenas aos sinais imunes, mas podem também estar modulando diretamente as células imunes na inflamação (BARAL; UDIT; CHIU, 2019;

CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). A ativação de nociceptores, especialmente fibras C, produz a liberação de neuropeptídeos, como a SP e o CGRP, resultando na geração da inflamação neurogênica. Os neuropeptídios além de atuarem sobre as células endoteliais vasculares e musculares lisas, também atraem e atuam diretamente sobre as células imunológicas (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; TALBOT; FOSTER; WOOLF, 2016).

Entre as células imunes residentes e que participam da defesa imune inata e de reações alérgicas, estão os mastócitos (REN; DUBNER, 2010). Minutos após uma reação inflamatória os mastócitos sofrem degranulação, ou seja, liberam o conteúdo presente em seus grânulos que contém vários mediadores inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), citocinas, entre elas as interleucinas (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas, ATP, NGF, entre outros, contribuindo para a cascata inflamatória (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; REN; DUBNER, 2010).

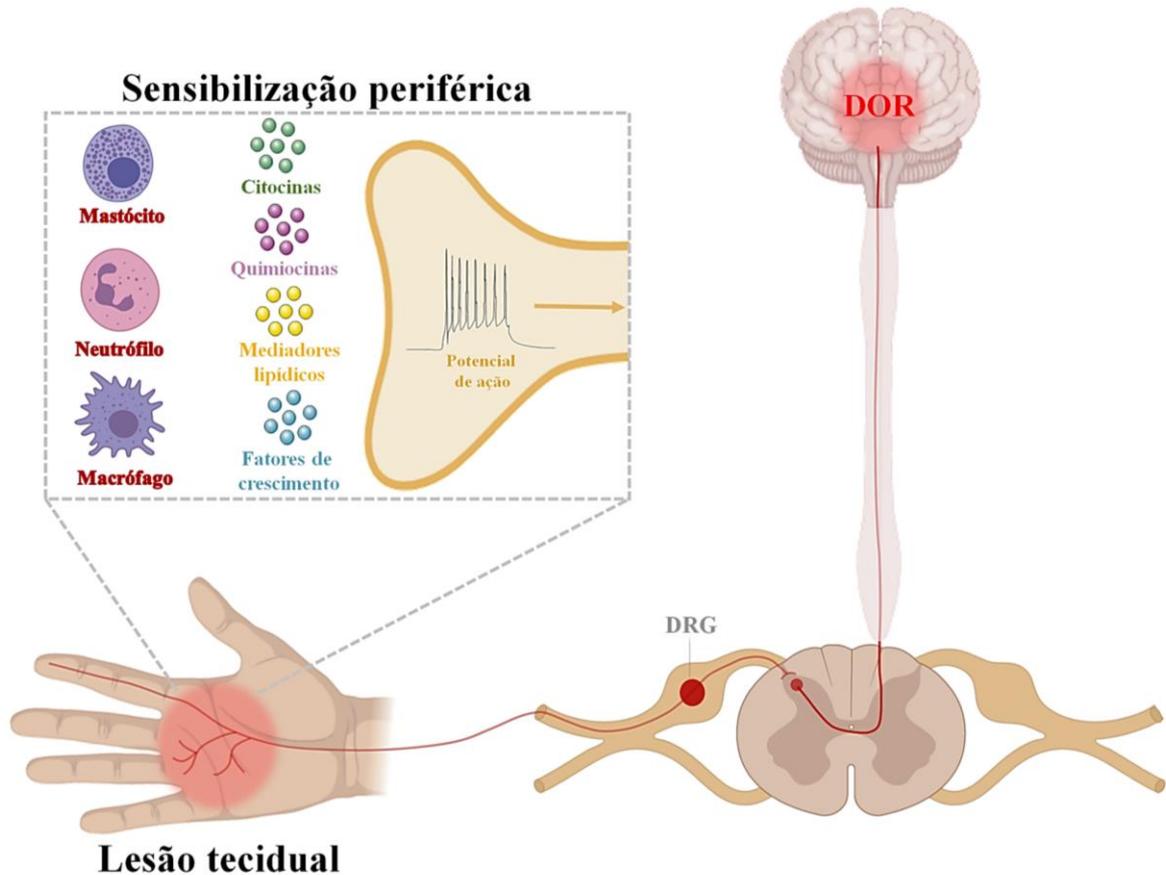
Os macrófagos são células mieloides sentinelas presentes em todo o corpo, derivados de monócitos circulantes que são recrutadas de forma proeminente para o local da lesão. Amadurecem em algumas horas para aumentar a proporção de macrófagos na área inflamada em dias a semanas (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; REN; DUBNER, 2010). Assim como os monócitos, os neutrófilos que são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes, também extravasam para o tecido danificado e se acumulam no local da lesão. Essa migração já inicia na primeira hora após a lesão tecidual, sendo influenciada em grande parte, pelos neuropeptídios SP e CGRP liberados pelos nociceptores (REN; DUBNER, 2010). Após o recrutamento e ativação, os macrófagos e neutrófilos também secretam citocinas inflamatórias, entre outros mediadores pró-inflamatórios que podem agir sobre os neurônios nociceptivos (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; REN; DUBNER, 2010).

Os mediadores inflamatórios liberados durante o processo inflamatório gerando a “sopa inflamatória”, agem sobre os terminais nervosos periféricos dos neurônios nociceptivos, podendo evocar dor por meio da ativação direta dos nociceptores, e também indiretamente, através da sensibilização destes nociceptores (MATSUDA; HUH; JI, 2019). Para isso, os mediadores inflamatórios agem sobre seus respectivos receptores expressos nos nociceptores, incluindo receptores ionotrópicos, receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e receptores de tirosina quinase. Isso resulta na ativação de vias de sinalização intracelular e conseqüentemente na fosforilação dos canais iônicos  $\text{Na}_v$  e TRPs, desencadeando um estado de hipersensibilidade e hiperexcitabilidade dos neurônios nociceptivos, conhecido como sensibilização periférica (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; BASBAUM et al., 2009; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Sob essas condições de sensibilização, um estímulo normalmente inócua, como o toque

leve passa a ser percebido como doloroso (alodinia), e a dor evocada por um estímulo normalmente doloroso é exagerada em intensidade e duração (hiperalgesia), além de ocorrer dor espontânea (dor em repouso devido a descargas espontâneas de neurônios nociceptivos) (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; BASBAUM et al., 2009; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Uma vez estabelecida a sensibilização periférica, aumentam as entradas nociceptivas na medula espinhal o que leva ao aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e neuropeptídeos (SP e CGRP) pelos terminais centrais dos aferentes primários no corno dorsal medula espinhal (JI et al., 2018). Esse processo amplifica a inflamação local e assim, contribui para o aumento da excitabilidade da membrana neuronal e eficácia sináptica, fenômeno denominado de sensibilização central. Além deste processo ser crítico para a persistência e cronicidade da dor, também está envolvido com uma característica adicional importante da dor inflamatória, que é o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, ou seja, uma área de hipersensibilidade à dor em torno da zona ferida ou inflamada (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; WOOLF, 2019).

No corno dorsal da medula espinhal, também podem ocorrer interações neuroimunes que contribuem para os mecanismos centrais da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019). Em casos de dor inflamatória crônica e dor neuropática, por exemplo, as células T, microglia e astrócitos são ativadas a partir de mediadores liberados dos terminais centrais dos neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal. Após a ativação, estas células também liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que atuam nos terminais nervosos pré-sinápticos e pós-sinápticos para aumentar a neurotransmissão contribuindo para a sensibilização central da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; JI et al., 2018; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).



**Figura 3 – Mecanismos da dor inflamatória:** A lesão tecidual leva a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios a partir de células residentes ou infiltradas no tecido danificado, ocasionando um fenômeno denominado como “sopa inflamatória”. Os mediadores inflamatórios que compõe a “sopa inflamatória” podem ativar direta ou indiretamente os neurônios sensoriais que inervam o tecido lesionado provocando dor. Adaptado de Baral, Udit e Chiu (2019).

Normalmente na inflamação aguda, a dor costuma ser paralela à resposta imune e diminuir com a resolução da inflamação (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). No entanto, em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide e gota, os gatilhos imunológicos persistentes, medeiam a dor de longa duração devido às diferentes alterações neuronais (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A partir dos mecanismos associados com o desenvolvimento de dor inflamatória que partem desde a lesão tecidual (como as que ocorrem nas queimaduras) e subsequente resposta inflamatória, gerando um estado de hipersensibilidade dolorosa em decorrência da sensibilização da área afetada, entende-se que a dor inflamatória configura uma importante característica das queimaduras (BASBAUM et al., 2009; TRACEY, 2017).

#### 4.1.2.3 Dor neuropática

De maneira distinta da dor nociceptiva e inflamatória, a dor neuropática é identificada por não ser protetora e sim patológica, manifestada em consequência de alterações no funcionamento do sistema nervoso (WOOLF, 2010). A plasticidade maladaptativa nas vias nociceptivas causa alterações persistentes que podem levar à dor espontânea e amplificação sensorial. Devido suas características, a dor neuropática não é um sintoma de algum distúrbio, mas sim, representa um estado de doença patológica do sistema nervoso por si só, independente do fator etiológico que o desencadeou (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010, 2019).

A dor neuropática surge como uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial, mais frequentemente o sistema nervoso periférico (SNP), mas também o SNC, alterando sua estrutura e função (COLLOCA et al., 2017; WOOLF, 2010). Assim, a dor neuropática pode ser resultado de diferentes condições etiológicas que afetam o SNC ou SNP. Periféricamente, a dor neuropática pode ser consequência de uma doença metabólica, por exemplo, neuropatia diabética, mas também de um trauma mecânico, substâncias químicas neurotóxicas, infecções bacterianas ou virais, agentes quimioterápicos e queimaduras. Já, lesões na medula espinhal, acidente vascular cerebral e esclerose múltipla são exemplos de condições que afetam o SNC e podem resultar em dor neuropática central (COLLOCA et al., 2017; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A lesão neural produz sintomas comuns de um estado doloroso, onde os sintomas positivos são o desenvolvimento de alodinia e hiperalgesia e sintomas peculiares, como parestesia (sensações cutâneas, como frio, calor, formigamento, agulhadas e adormecimento) e sintomas negativos, como a disestesia (enfraquecimento ou alteração na sensibilidade ou sensação dos sentidos, como do tato) (COLLOCA et al., 2017; WOOLF, 2019). Esses sintomas geralmente persistem e têm tendência a se tornar crônicos, respondendo menos aos analgésicos. Distúrbios do sono, ansiedade e depressão também são frequentes em pacientes com dor neuropática. Portanto, a dor neuropática é uma condição dolorosa que pode ser acompanhada de comorbidades que acabam afetando a qualidade de vida do paciente (COLLOCA et al., 2017).

Quanto as bases mecanicistas para o desenvolvimento da dor neuropática, a lesão nervosa provoca alterações estruturais e funcionais dos nociceptores periféricos, desencadeando potenciais de ação ectópicos, decorrentes de membranas hiperexcitáveis. Essa hiperexcitabilidade pode ser resultado da expressão gênica alterada e mudanças nos canais iônicos, onde ocorre um aumento dos canais de sódio e uma redução dos canais de potássio, o

que aumenta a excitabilidade da membrana o suficiente para que os potenciais de ação sejam gerados espontaneamente (COLLOCA et al., 2017; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002). Alterações estruturais e funcionais também ocorrem nos circuitos do SNC, de modo que ocorre um desequilíbrio entre a sinalização central excitatória e inibitória, com uma facilitação permanente entre as conexões sinápticas excitatórias e a perda de conexões sinápticas inibitórias. Além de serem observadas alterações nos mecanismos de desinibição ou facilitação da transmissão de sinais sensoriais ao nível do corno dorsal da medula espinhal (COLLOCA et al., 2017; WOOLF, 2019). Nas últimas décadas evidências vêm demonstrando que frequentemente a dor neuropática é acompanhada por mudanças em células gliais, como a microglia e astrócitos (INOUE; TSUDA, 2018; WOOLF, 2019).

Embora a dor neuropática afete cerca de 7 a 10% da população mundial, a maioria dos pacientes não apresenta um alívio satisfatório com os tratamentos existentes (COLLOCA et al., 2017; SCHOLZ et al., 2019). Por reconhecer a importância de se identificar a dor neuropática, a classificação mais recente da IASP para a CID-11 identifica códigos específicos para a dor neuropática crônica, que até a sua última versão eram insuficientemente definidas ou até mesmo ausentes. Nessa classificação estão listadas as condições mais comuns de dor neuropática periférica (neuralgia trigeminal, lesão de nervo periférico, polineuropatia dolorosa, neuralgia pós-herpética e radiculopatia dolorosa) e central (dor causada pela lesão da medula espinhal ou cerebral, dor após um acidente vascular cerebral e dor associada à esclerose múltipla) (SCHOLZ et al., 2019).

A dor neuropática também é uma consideração importante nas queimaduras, uma vez que uma porção significativa de pacientes possui o risco de desenvolver dor neuropática após a cicatrização do tecido danificado pela queimadura (GRAY; WILLIAMS; CRAMOND, 2008).

#### *4.1.2.4 Dor disfuncional/nociplástica*

Diferentemente das outras condições dolorosas citadas acima, que ocorrem na presença de um estímulo nocivo (dor nociceptiva), inflamatório (dor inflamatória) ou decorrente de danos ao sistema nervoso (dor neuropática), a dor disfuncional inclui a dor que ocorre na ausência de qualquer um destes estímulos (WOOLF, 2010, 2019). A dor disfuncional é caracterizada por sintomas de dor crônica generalizada ou regional, onde a dor parece resultar de uma amplificação autônoma de sinais nociceptivos dentro do SNC, devido ao funcionamento anormal ou maladaptativo do sistema nervoso. No entanto, a patofisiologia subjacente ainda precisa ser melhor identificada (CLAUW, 2015; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009;

NAGAKURA, 2015). Fibromialgia, síndrome do intestino irritável e distúrbio da articulação temporomandibular, são exemplos importantes deste tipo de dor (NAGAKURA, 2015; WOOLF, 2019). Pacientes com esses distúrbios tem um grande impacto negativo na qualidade de vida, devido a dor inexplicável, além de enfrentarem a falta de terapias eficazes e os altos custos com cuidados de saúde (NAGAKURA, 2015).

Recentemente, a IASP adotou o termo “dor nociplástica” como proposta de um novo descritor mecanicista de dor. A definição publicada em 2017, descreve a dor nociplástica, como: “Dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara ou ameaça de dano tecidual real causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor” (IASP, 2017). A dor nociplástica, destina-se a descrever casos de dor que não se encaixam nas definições de dor nociceptiva ou dor neuropática (AYDEDE; SHRIVER, 2018; KOSEK et al., 2016). Portanto, a dor nociplástica pode ser usada para descrever condições de dor crônica que são caracterizadas pelo processamento nociceptivo alterado, como a fibromialgia, síndrome de dor regional complexa tipo 1, dor lombar crônica inespecífica, síndrome do intestino irritável e outros distúrbios de dor visceral (KOSEK et al., 2016).

## 4.2 QUEIMADURAS

As lesões causadas por queimaduras são uma das causas mais frequentes de perda de integridade da pele, resultando em um desequilíbrio fisiológico importante, alteração funcional e inclusive morte (QUEIROZ et al., 2016). Em vista disso, as queimaduras configuram um grande problema de saúde pública mundial, pois estão associadas a taxas significativamente altas de morbidade e mortalidade (KOÇ; SAGLAM, 2012; MCINTYRE et al., 2016). Portanto, as queimaduras representam uma condição debilitante de alto impacto social, pois afetam uma ampla faixa etária, incluindo pacientes adultos jovens em idade produtiva, estando muitas vezes associadas à sequelas permanentes (QUEIROZ et al., 2016).

Segundo a OMS mais de 180 mil mortes por ano no mundo todo estão associadas a queimaduras (WHO, 2018). Uma pesquisa realizada com a ferramenta *Global Burden of Disease Study*, relatou que em 2017 as queimaduras foram responsáveis por aproximadamente 9 milhões de novos ferimentos e 120.632 mortes (JAMES et al., 2020). Além disso, foi evidenciado que existe uma grande desproporção entre os países na incidência das mortes por queimaduras, uma vez que cerca de 90% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda,

regiões que geralmente carecem de infraestrutura necessária para reduzir a incidência e a gravidade das queimaduras (JAMES et al., 2020; PECK; PRESSMAN, 2013).

No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, cerca de 1 milhão de incidentes envolvendo queimaduras ocorrem a cada ano. Um estudo epidemiológico realizado utilizando a plataforma online DATASUS, que apresenta dados do número de óbitos e internações hospitalares à nível nacional, demonstrou que entre 2008 e 2014, um total de 17.624 pessoas morreram e 129.858 pessoas foram internadas em hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS) em razão de queimaduras, resultando em uma taxa média anual de 2.466 mortes e 18.551 internações (CITRON et al., 2018). Neste estudo, a incidência e o número de mortes em decorrência das queimaduras foi maior no sexo masculino, característica semelhante a observada em um estudo realizado em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de um Centro de Queimados na região sul do Brasil, onde as queimaduras também aconteciam mais frequentemente em adultos jovens do sexo masculino (QUEIROZ et al., 2016).

Com uma taxa média de 18 mil internações ao ano em decorrência de queimaduras, o custo anual de pacientes admitidos em hospitais de todos os estados brasileiros estima-se em US\$ 18 milhões de dólares. Dentro de um período de 10 anos (2008 – 2017) o custo geral para 170.554 internações foi de US\$ 158.332.891,11 de dólares (SAAVEDRA et al., 2019).

Embora o tratamento para queimaduras tenha sido aperfeiçoado ao longo das últimas décadas, o que conseqüentemente reduziu os índices de mortalidade e melhorou a resposta dos pacientes frente aos tratamentos farmacológicos, há evidências crescentes de impactos negativos ao longo da vida dos pacientes causados devido às lesões das queimaduras. Nesse sentido, são relatados desafios físicos e psicológicos múltiplos e de longo prazo que podem ter início muito depois da cicatrização da lesão inicial causada pela queimadura, demonstrando que a queimadura está associada a uma série de patologias secundárias (BARRETT et al., 2019). Uma revisão da literatura realizada por Barrett et al. (2019) evidenciou inúmeras condições secundárias que podem estar associadas as queimaduras, entre elas, o risco aumentado de infecções, distúrbios musculoesqueléticos, doenças gastrointestinais, câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso, ansiedade e depressão.

De forma geral, a dor é o sintoma mais frequente e relevante relatado durante a fase aguda e de reabilitação em pacientes com queimaduras (BOLUDA PÉREZ et al., 2016; SUMMER et al., 2007). Além disso, o controle inadequado da dor aguda causada pelas queimaduras, assim como outros tipos de trauma contribui para a cronicidade do sintoma, como o desenvolvido pela dor neuropática, prolongando o tempo de reabilitação do paciente o que

resulta em altos custos com assistência médica (RICHARDSON; MUSTARD, 2009; SUMMER et al., 2007; TAN; LAW; GAN, 2015).

Pacientes com queimaduras graves sofrem frequentemente de dor crônica persistente, impactando negativamente nas funções e na qualidade de vida. A dor crônica ou de longo prazo continua sendo um problema para um número significativo de sobreviventes de queimaduras e foi estimado em 52% de 358 entrevistados após em média 11 anos da ocorrência das lesões da queimadura (DAUBER et al., 2002). Além disso, a cronicidade da dor causada por queimaduras pode estar associada com o aparecimento de condições psicológicas e emocionais, como ansiedade, insônia e depressão (EDWARDS et al., 2007; MCINTYRE et al., 2016).

As lesões causadas pelas queimaduras podem ter diversas causas, como fontes químicas ou elétricas, atrito, agentes térmicos como o frio e o contato direto com chama, superfície ou líquido quente e também a radiação ultravioleta (UV) (CHURCH et al., 2006; JESCHKE et al., 2020; LOPES; MCMAHON, 2016).

#### **4.2.1 Radiação Ultravioleta**

A radiação ultravioleta (UV), infravermelha e visível alcançam a superfície da Terra e compreendem quase em sua totalidade o espectro de radiação eletromagnética emitida pelo sol (BARON; SUGGS, 2014). Embora, a radiação UV seja a energia emitida pelo sol que atinge a Terra em menor quantidade (aproximadamente 5%), é a área do espectro eletromagnético considerada biologicamente mais ativa e, portanto, de maior impacto na saúde e na doença (BARON; SUGGS, 2014; ROMANHOLE et al., 2015).

A radiação UV é dividida em três faixas, radiação ultravioleta A (UVA), B (UVB) e C (UVC). Essa classificação é de acordo com a faixa de comprimento de onda que cada radiação abrange, sendo que os raios UVA abrangem os comprimentos de onda mais longos (315 – 400 nm), os raios UVB estão na faixa intermediária (290 – 320 nm) e os raios UVC possuem os comprimentos de onda mais curtos (100 – 280 nm) (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

O ozônio e oxigênio na atmosfera absorvem completamente a radiação UVC, além de absorverem também a maioria (aproximadamente 90%) da radiação UVB (SCHUCH et al., 2013). Assim, a radiação UV solar de relevância para a saúde humana e ecossistemas consiste na energia da radiação UVA (90 - 95%) e UVB (5 - 10%) (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; SCHUCH et al., 2013). Em consequência das alterações do ozônio na estratosfera que ocorreram nas últimas décadas, houve mudanças na radiação UV que alcança a superfície da

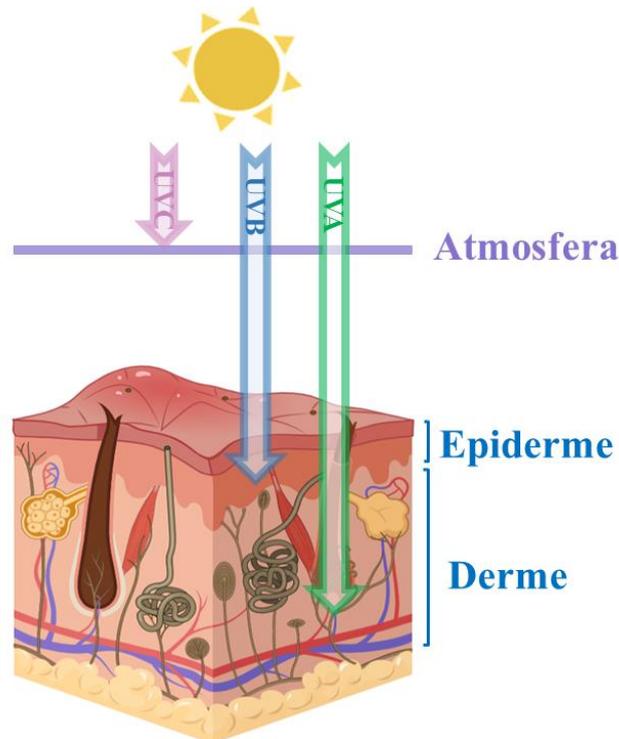
Terra e no clima, com implicações para a saúde humana, ecossistemas marinhos e terrestres (BARNES et al., 2019). A descoberta do "buraco" de ozônio na década de 1980 gerou grande preocupação em todo o mundo, uma vez que a radiação UVB é fortemente impactada pelo esgotamento do ozônio estratosférico, aumentando sua incidência e, portanto, seus efeitos biológicos e físicos correspondentes (BARNES et al., 2019; SCHUCH et al., 2017).

A intensidade da radiação UV solar varia geograficamente de acordo com a intensidade da luz solar em um determinado local da Terra, além disso, pode ser influenciada por diferentes fatores, que vão desde fatores meteorológicos, a geográficos e temporais (ORAZIO et al., 2013; SCHALKA et al., 2014). Condições como a região, a estação do ano, hora do dia, latitude e altitude e características atmosféricas além do ozônio, como a presença de nuvens e aerossóis oriundos da poluição de áreas urbanas, também podem influenciar na intensidade da radiação UV solar que atingirá a superfície da Terra (SCHALKA et al., 2014; SCHUCH et al., 2017). Um exemplo importante é a influência da altitude, uma vez que regiões com altitudes mais baixas possuem uma menor intensidade de radiação UV, isso porque o caminho através da atmosfera é mais longo até atingir a Terra. Por outro lado, a radiação UV é mais intensa nos trópicos, regiões com altitudes mais elevadas e atmosfera mais fina, resultando em uma menor atenuação, e conseqüentemente, maior intensidade de radiação UV (ORAZIO et al., 2013; SCHUCH et al., 2013, 2017).

No entanto, além da intensidade da radiação UV solar deve ser considerado que a quantidade de radiação UV a qual estamos expostos depende também de fatores individuais, como o tempo gasto ao ar livre, uso de roupas com proteção UV e protetores solares (ORAZIO et al., 2013). O Brasil por ser um país com um território extenso, de dimensões continentais, localizado entre o Equador e o Trópico de Capricórnio, torna o Brasil um dos países do mundo com maior extensão de terra próximo ao sol. Em conjunto, com as características culturais, clima e longa extensão de praias, os brasileiros estão entre os povos com maior exposição solar (ORAZIO et al., 2013; SCHALKA et al., 2014). Dados da Sociedade Brasileira de Dermatologia, demonstram que mesmo no inverno uma pessoa exposta a luz solar sem proteção, recebe uma dose de radiação UV superior a recomendada, um dado preocupante uma vez que isso é realidade para muitos trabalhadores brasileiros (SCHALKA et al., 2014).

Sendo a radiação UVC absorvida pelo ozônio, os raios solares que são capazes de ultrapassar a camada de ozônio e incidir sobre a Terra são compostos principalmente de UVA e UVB. Conseqüentemente, a radiação UV é um dos inúmeros fatores ambientais que atingem a pele devido à sua localização anatômica no limite externo do corpo (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014). Quanto a capacidade de penetrar na pele esta possui uma relação direta com

o comprimento de onda de cada radiação. Nesse caso, a radiação UVA, de comprimento de onda mais longo, penetra nas camadas mais profundas da pele alcançando a derme, enquanto a radiação UVB, de comprimento de onda na faixa intermediária, é absorvida principalmente pela epiderme atingindo pouco a derme (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; LIEBEL et al., 2012).



**Figura 4 - Radiação ultravioleta e a pele:** Uma vez que a radiação UVC é absorvida pela atmosfera, a radiação UV emitida pela luz solar que atinge a Terra é composta pela radiação UVA e UVB. A radiação UVA de comprimento de onda maior, atinge camadas mais profundas da pele (derme), enquanto que a radiação UVB de comprimento de onda intermediário, atinge camadas mais superficiais da pele (epiderme). Adaptado de Amaro-Ortiz; Yan e D’Orazio (2014) e D’Orazio et al. (2013).

Os efeitos da exposição à radiação UV solar podem ser positivos e negativos para a saúde humana (SCHUCH et al., 2017). Para um resultado equilibrado entre os riscos e benefícios, deve se considerar que a dose de radiação UV necessária pode variar de acordo com a idade, sexo, tipo de pele e localização (BARNES et al., 2019). Dentre os benefícios da exposição da pele à radiação UV, principalmente a UVB, o mais conhecido é a síntese de vitamina D, que desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase do cálcio no corpo e em outros processos importantes (ORAZIO et al., 2013; SCHUCH et al., 2017). Há também evidências crescentes de outros benefícios da exposição à radiação UV e visível, como na

modulação imunológica, sendo importante para doenças de pele, como psoríase, e possivelmente para doenças autoimunes sistêmicas, como esclerose múltipla (LUCAS et al., 2019).

Em contraste, a radiação UVA e UVB também estão associadas a inúmeras alterações cutâneas tanto agudas como crônicas, sendo responsáveis pela maior porcentagem de patologias cutâneas induzidas pelo meio-ambiente, devido a sua capacidade de causar eritema, inflamação, aceleração do envelhecimento cutâneo e a longo prazo, o câncer. Uma vez que cada tipo de radiação, UVA e UVB, atinge diferentes regiões na pele, ambas podem exercer uma variedade de efeitos sobre a fisiologia da pele, como nas camadas cutâneas, células e moléculas e assim proporcionar diferentes respostas celulares e moleculares (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; LOPES; MCMAHON, 2016; ORAZIO et al., 2013).

A radiação UVA anteriormente era considerada relativamente inócua, no entanto hoje já se reconhece sua capacidade em danificar o DNA, proteínas e lipídios, resultando em efeitos prejudiciais (SCHUCH et al., 2017). Nesse sentido, a radiação UVA pode induzir danos ao DNA por meio de mecanismos diretos e indiretos. Indiretamente, a radiação UVA está envolvida com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar o DNA por meio de reações de fotossensibilização. Os raios UVA por penetrarem até camadas mais profundas da pele também apresentam um alto potencial para causar danos diretos na estrutura do DNA, e à longo prazo favorecer o aparecimento do câncer de pele. Além disso, devido suas propriedades de alta penetração na pele, a radiação UVA pode acelerar o foto-envelhecimento (aparecimento de rugas), assim como demonstra contribuir com a pigmentação da pele e oxidação da melanina ocasionando o escurecimento rápido da pele e causando eritema (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; ORAZIO et al., 2013).

Já a radiação UVB, por ser biologicamente mais ativa, ao atingir a camada epidérmica da pele faz com que os raios que incidem sobre a pele sejam absorvidos pelo DNA, causando rearranjos moleculares, denominados dímeros de ciclobutano, os quais favorecem a formação de fotoprodutos mutagênicos específicos, como por exemplo, os fotoprodutos de pirimidina (6-4) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; ORAZIO et al., 2013). Mecanismos de reparo celular são importantes para resolverem a formação destes rearranjos moleculares e fotoprodutos (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). Uma vez que a formação dos subprodutos do DNA excede significativamente a capacidade dos mecanismos de defesa celulares, ocorrem mutações nas sequências de DNA das células da pele, o que favorece o aparecimento do câncer de pele, incluindo melanoma cutâneo maligno e os cânceres de pele não melanoma (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; MATSUMURA;

ANANTHASWAMY, 2004). No entanto, uma das principais características da radiação UVB, é que ao incidir sobre a pele, ela é potencialmente capaz de gerar um processo inflamatório, caracterizado pelo surgimento de edema, espessamento da derme, epiderme e estrato córneo e ainda como destaque o eritema ou popularmente conhecido como queimadura solar (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001; LOPES; MCMAHON, 2016).

A queimadura solar é uma reação inflamatória cutânea aguda, que ocorre após a exposição excessiva da pele à radiação UV, sendo causada exclusivamente pela radiação UVB (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; LOPES; MCMAHON, 2016). A tendência de desenvolver uma queimadura solar após exposição à radiação UV está inerente a cor da pele ou fototipo individual. A “Escala de Fitzpatrick” é uma escala semiquantitativa composta por seis fototipos que descrevem a cor da pele, nível de melanina, resposta inflamatória (queimadura solar) e o risco de câncer. De forma geral, segundo essa classificação, indivíduos com um tom de pele mais escuro, portanto, um fototipo alto, geralmente queimam menos e bronzeiam mais facilmente. Ao contrário, os indivíduos com fototipo I e II (em sua maioria) sempre queimam e nunca se bronzeiam, conseqüentemente esses apresentam maior incidência de câncer de pele quando comparado aos fototipos mais elevados (BARON; SUGGS, 2014; ORAZIO et al., 2013).

A exposição excessiva da pele à radiação UV é comum em regiões tropicais e temperadas e pode resultar em queimaduras solares (LOPES; MCMAHON, 2016). Em países tropicais, como o Brasil, as queimaduras solares afetam grande parte da população, com incidência de 48,7% em adolescentes e adultos jovens na região sul do país (HAACK; HORTA; CESAR, 2008). Dados epidemiológicos de países do norte da Europa e Estados Unidos também demonstram alta prevalência de queimaduras solares, afetando quase 75% dos adolescentes e adultos jovens nos EUA e mais de 50% da mesma faixa etária nos países da Europa (BULLER et al., 2011; LOPES; MCMAHON, 2016).

A resposta inflamatória gerada após o dano tecidual, como aquele provocado pela queimadura, inicia-se minutos após a lesão e persiste por dias, a fim de amenizar a lesão e proporcionar o reparo tecidual (REN; DUBNER, 2010; RICHARDSON; MUSTARD, 2009). Após a lesão tecidual, ocorre uma cascata de eventos que por sua vez, dão origem aos sinais cardinais iniciais da inflamação, originalmente postulados por Celsus que são caracterizados pelo desenvolvimento de eritema (vermelhidão) ou rubor, calor ou aumento da temperatura, edema ou inchaço e dor (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; GRACE et al., 2014).

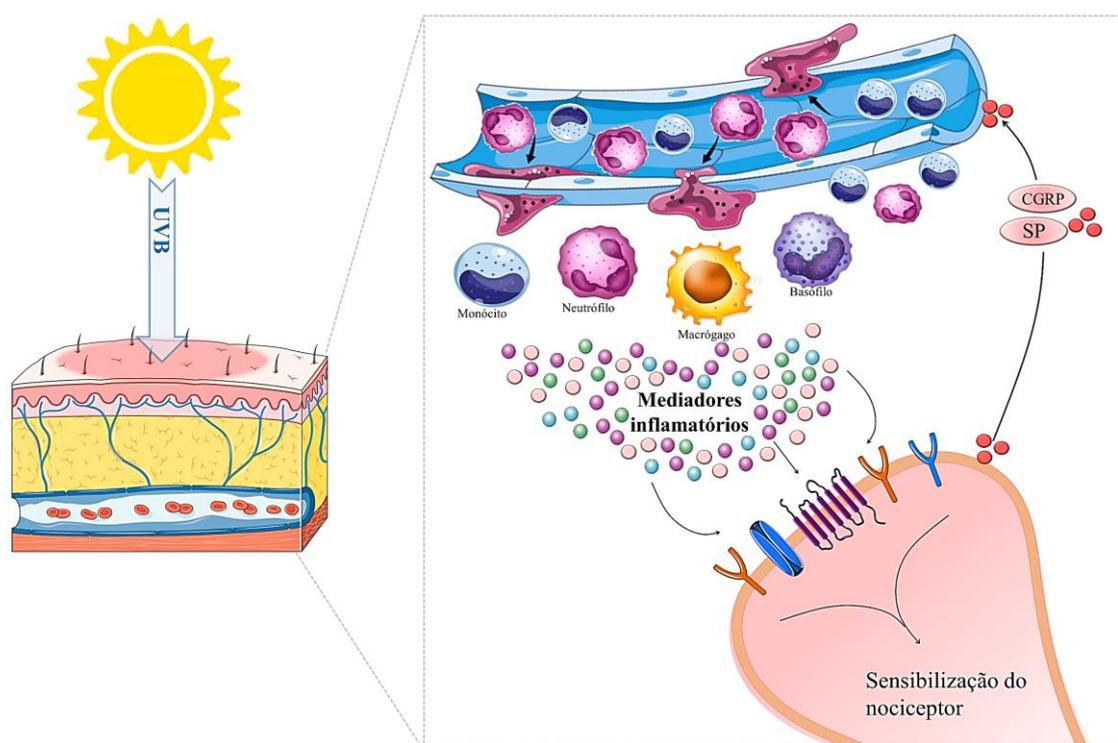
Este processo inflamatório é frequentemente acompanhado pelo acúmulo de mediadores endógenos liberados tanto de células neuronais ativadas ou pelas células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesada, incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (BASBAUM et al., 2009; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). A pele é um tecido que comparado a outros possui uma vasta e densa inervação de neurônios sensoriais (GOLD; GEBHART, 2010). Estes neurônios nociceptivos semelhante as células do sistema imune, possuem vias que permitem o reconhecimento de condições que ameaçam a integridade do tecido, e como resposta desenvolvem uma comunicação com o sistema imunológico, formando um mecanismo de proteção integrado (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012).

Os terminais periféricos dos nociceptores liberam principalmente os neuropeptídeos, SP e CGRP que atuam sobre a vasculatura, o que caracteriza o desenvolvimento da inflamação neurogênica. Estes neuropeptídeos contribuem para o desenvolvimento do edema, eritema e calor no local da lesão. Nesse sentido, o CGRP por meio da sua ação sobre as células endoteliais que liberam óxido nítrico, leva à vasodilatação, que está associada com o desenvolvimento de eritema (vermelhidão), devido ao aumento do fluxo sanguíneo neste local (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; TRACEY, 2017). O eritema atinge um pico entre 24 e 48 horas após a exposição à radiação UVB (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001). A substância P por sua vez, ativa o seu receptor NK1 nas células endoteliais promovendo um aumento da permeabilidade vascular, o que leva ao extravasamento plasmático, e conseqüentemente o desenvolvimento de edema e calor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012).

A atividade dos neuropeptídeos liberados pelos neurônios sensoriais não se limita apenas a sua ação sobre a vasculatura, mas também atuam na quimiotaxia leucocitária de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão e na ativação da resposta imune. Estes mediadores sinalizam para que os mastócitos e células dendríticas residentes nos tecidos iniciem a sua resposta imune, induzindo a degranulação e a produção de citocinas nessas células (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). Além da resposta inicial das células residentes, as células infiltrantes também liberam mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e outros mediadores, contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória (AMARO-ORTIZ; YAN; ORAZIO, 2014; BASBAUM et al., 2009).

Uma vez que ocorreu o recrutamento de células inflamatórias e a liberação de mediadores inflamatórios, os mesmos são capazes de ativar direta ou indiretamente os

nociceptores periféricos, e assim desenvolver a dor inflamatória induzida pela queimadura solar. Essas interações aumentam a excitabilidade da fibra nervosa e com a sensibilização periférica os nociceptores podem ser ativados por estímulos normalmente inócuos, denominado de alodinia, ou os estímulos passam a ser detectados de forma mais intensa e prolongada, hiperalgesia (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; TRACEY, 2017). Com base nisso, após uma queimadura solar intensa, por exemplo, a água morna durante o banho, ou o contato da pele com as roupas podem ser dolorosos (alodinia), enquanto um tapa ou um banho muito quente podem ser extremamente dolorosos (hiperalgesia) (PRESCOTT; RATTÉ, 2017).



**Figura 5 – Queimadura solar e a resposta inflamatória:** O dano tecidual, como o provocado pela queimadura solar, leva a liberação de mediadores inflamatórios a partir de nociceptores ativados e de células residentes e recrutadas ao local da lesão (monócitos, neutrófilos, macrófagos e basófilos). SP e CGRP liberadas dos nociceptores agem sobre os vasos sanguíneos, aumentando a permeabilidade vascular com consequente extravasamento plasmático e também promovem a adesão e a transmigração de células imunes para o local da lesão. Essas células, uma vez ativadas, liberam uma ampla gama de mediadores inflamatórios que atuam nos receptores expressos nas terminações nervosas dos nociceptores, levando à sensibilização do nociceptor periférico. Adaptado de Ren e Dubner (2010) e Ji, Xu e Gao (2014).

Alguns aspectos da resposta inflamatória induzida pela queimadura solar como o desenvolvimento de hipersensibilidade frente à estimulação térmica ou mecânica que atingem o pico entre 24 e 48 horas após a exposição à radiação UVB, já foram evidenciados em humanos

(BISHOP et al., 2009; HARRISON; YOUNG; MCMAHON, 2004) e roedores (BISHOP et al., 2007, 2010; DAWES et al., 2011). A sensibilização induzida pela radiação UVB é restrita ao local da irradiação, sendo induzida por mediadores que atuam periféricamente. Mediadores inflamatórios com expressão aumentada já foram identificados após a irradiação UVB em humanos e roedores, incluindo IL-1 $\beta$  e IL-6 (ANGST et al., 2008). As quimiocinas também apresentam um padrão de expressão diferente, onde o CXCL5 parece estar envolvido em grandes proporções no desenvolvimento da dor induzida pela radiação UVB (DAWES et al., 2011). Mediadores lipídicos, leucotrienos e prostaglandinas também foram encontrados significativamente aumentados em amostras de pele de camundongos após a queimadura induzida pela radiação UVB (SISIGNANO et al., 2013). Por outro lado, a radiação UVB não acarreta em uma sensibilização central, uma vez que já se demonstrou que o receptor NMDA não está envolvido no desenvolvimento da hipersensibilidade (BISHOP et al., 2010).

Portanto, devido às suas características, o modelo de queimadura solar induzido pela radiação UVB tornou-se uma ferramenta útil e amplamente utilizada no estudo da dor inflamatória, pois é um dos poucos modelos pré-clínicos que permitem confiança na translação para estudos clínicos (BISHOP et al., 2007; LOPES; MCMAHON, 2016). Esse modelo produz uma resposta inflamatória aguda e localizada, que leva à sensibilização periférica e desencadeia uma série de alterações sensoriais, processo observado de forma muito semelhante entre humanos e roedores. Assim, o uso do modelo de queimadura solar induzida pela radiação UVB é relevante, seja, para o estudo dos possíveis efeitos de novos alvos terapêuticos para essa condição clínica, como também para o entendimento de mecanismos envolvidos na dor inflamatória induzida pela radiação UVB (BISHOP et al., 2007, 2010; HARRISON; YOUNG; MCMAHON, 2004; LOPES; MCMAHON, 2016).

#### **4.2.2 Tratamentos para queimaduras**

Apesar da alta prevalência, atualmente ainda não há tratamentos disponíveis que revertam completamente o processo inflamatório e as alterações sensoriais associadas com a queimadura solar (KADDOURA et al., 2017; LOPES; MCMAHON, 2016). Os tratamentos disponíveis são pouco específicos e visam principalmente aliviar o desconforto do paciente, causado pela dor em decorrência da inflamação instalada no local da lesão da queimadura (HAN; MAIBACH, 2004; MCINTYRE et al., 2016).

A sulfadiazina de prata, um agente antibacteriano, tornou-se o tratamento padrão para queimaduras (MILLER et al., 2012). O uso da sulfadiazina de prata teve início na década de

1960, quando a prata começou a ser usada sob a forma de nitrato de prata no tratamento de feridas de pacientes queimados. Anos depois, a sulfadiazina de prata tornou-se o tratamento padrão para queimaduras, sendo utilizada na forma de creme na concentração de 1% (ATIYEH et al., 2006; BOWLER et al., 2004; KHORASANI et al., 2009). Seu uso se dá principalmente de forma profilática, devido a ação antimicrobiana para prevenir complicações infecciosas que podem resultar da queimadura, e também com a função de aumentar a cicatrização de feridas (KHORASANI et al., 2009; MILLER et al., 2012).

Atualmente, o que se sabe sobre seu mecanismo de ação é que o íon prata é capaz de causar precipitação de proteínas, agindo diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo a ação antimicrobiana (FULLER, 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual a sulfadiazina de prata age para reduzir a dor e a inflamação, ainda é pouco compreendido (FULLER, 2009; MILLER et al., 2012). Apesar, da sulfadiazina de prata ser bem consolidada no tratamento de queimaduras, seu uso está associado ao desenvolvimento de efeitos adversos que limitam sua utilização, como leucopenia, citotoxicidade celular, cicatrizes hipertróficas ou atróficas, reações de hipersensibilidade, dermatite alérgica de contato, eritema multiforme e pigmentação cinza-azulada (ATIYEH et al., 2006; FISHER; MARSH; LAZOVA, 2003; KHORASANI et al., 2009).

Além da sulfadiazina de prata, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e corticoides, também são alternativas para o tratamento dos sintomas relacionados com as queimaduras (FAURSCHOU; WULF, 2008; LOPES; MCMAHON, 2016). Os AINES são comumente usados em situações de dor inflamatória aguda, condição semelhante a induzida pela queimadura solar (LOPES; MCMAHON, 2016). Esta classe reduz a hipersensibilidade induzida pela radiação UVB (LOPES; MCMAHON, 2016), efeito que pode ser relacionado com a diminuição das prostaglandinas após a inibição da enzima COX pelos AINES (HOLFELD; SAXENA; SCHOR, 2013).

Os corticoides também são utilizados no tratamento da queimadura solar, acreditando-se que com a vasoconstrição alcançada com o uso de corticoides tópicos, ocorre uma redução imediata do eritema ou vermelhidão e do desconforto causado pelas queimaduras solares (FAURSCHOU; WULF, 2008). Lopes e McMahon (2016) avaliaram dados já obtidos do uso de corticoides na queimadura solar, no qual destacam que o uso destes de forma tópica pareceu ser benéfico para aliviar a dor desencadeada pela radiação UVB, enquanto o uso sistêmico é menos benéfico, presumivelmente por conta das limitações na dosagem. No entanto, ambos AINES e corticoides são capazes de provocar efeitos adversos, os quais acabam limitando seu uso (SOSTRES et al., 2010; UVA et al., 2012).

Devido à falta de especificidade dos medicamentos utilizados para o tratamento de pacientes com queimaduras e a ampla ocorrência de inúmeros efeitos adversos, torna-se necessário a busca de novos tratamentos, seguros e eficazes para o controle adequado da dor e inflamação associadas a queimaduras. Neste sentido, produtos de origem natural que apresentem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos têm o potencial de atuar como uma alternativa à terapêutica atualmente utilizada, tanto como tratamento único ou como terapia adjuvante.

Um produto de origem natural que tem recebido destaque no Brasil para o tratamento de pacientes com queimaduras é a pele de peixes do gênero Tilápia. A pele de tilápia carrega a promessa de um produto inovador e de fácil aplicação, que pode se tornar a primeira pele animal estudada nacionalmente e registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento de queimaduras (LIMA-JUNIOR et al., 2019; NUNES ALVES et al., 2015). Estudos já realizados demonstram que a pele da tilápia possui características microscópicas, semelhantes à estrutura morfológica da pele humana com uma elevada resistência e extensão à tração, e por essas características poderia servir como uma possível fonte de biomaterial para xenoenxertos (NUNES ALVES et al., 2015).

Em um ensaio pré-clínico usando um modelo experimental de queimadura em ratos foi observado que o uso da pele de tilápia como xenoenxerto melhorou o processo de cicatrização sem causar alterações relevantes em parâmetros hematológicos e bioquímicos (LIMA-JUNIOR et al., 2017). Recentemente, um estudo clínico randomizado de fase II, demonstrou que o uso da pele tilápia em pacientes queimados ajudou no processo de cicatrização, reduzindo o tempo para a completa reepitalização. Além disso, o uso da pele de tilápia, reduziu a necessidade de trocas de curativos em comparação ao uso sulfadiazina de prata. E por fim, a intensidade da dor dos pacientes que fizeram uso da pele de tilápia foi menor do que a dor dos pacientes tratados com a sulfadiazina de prata (LIMA JÚNIOR et al., 2020). Desta forma, o uso da pele de tilápia, como um material biológico, tem sido sugerido, como uma opção interessante para o manejo de queimaduras.

### **4.3 Plantas medicinais**

Atualmente, o interesse pela medicina natural cresce em todo o mundo (CAVINATO et al., 2017; DUTRA et al., 2016). Apesar deste interesse recente, o uso de plantas medicinais como recurso para tratar e curar doenças, são uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade, exercida desde milhares de anos antes de Cristo (CALIXTO, 2019; DUTRA et

al., 2016). Portanto, os produtos de origem natural desempenharam um papel fundamental na descoberta de medicamentos, sendo muitos dos fármacos clinicamente utilizados originários de espécies vegetais, como a vimblastina, vincristina, paclitaxel, etoposídeo, entre outros (KINGSTON, 2011).

Outros exemplos são analgésicos clinicamente importantes, como a morfina, codeína e ácido acetilsalicílico, que foram descobertos de forma empírica ou tiveram seu uso baseado na medicina popular. O alcaloide morfina foi isolado da papoula (*Papaver somniferum*), e a descoberta da morfina motivou a busca por outros compostos com potencial medicinal a partir de produtos de origem natural, e em anos seguintes o alcaloide codeína também foi isolado da papoula. No entanto, um marco histórico do desenvolvimento da indústria farmacêutica global, foi a descoberta do ácido acetilsalicílico, fármaco isolado a partir da salicina que era obtida das cascas do salgueiro (*Salix alba*) (CALIXTO et al., 2000; CALIXTO, 2019; DUTRA et al., 2016).

Notavelmente, a importância dos produtos naturais é enorme, uma vez que tem contribuído para o desenvolvimento de importantes fármacos utilizados atualmente na medicina moderna (CALIXTO et al., 2000). Estima-se, que cerca de 35% dos medicamentos comercialmente disponíveis são derivados direta ou indiretamente de fontes naturais, notadamente de plantas, microrganismos e de toxinas animais, embora sejam encontradas variações nestas estimativas pois dependem da definição do que é considerado um medicamento derivado de produto natural (CALIXTO, 2003, 2019). Além disso, em áreas como a oncologia a contribuição dos produtos naturais é ainda maior, onde a quantidade de medicamentos derivados de plantas é em torno de 70% (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Como recursos extremamente importantes para as empresas farmacêuticas globais e para o desenvolvimento de novos medicamentos, os produtos de origem natural podem ter diferentes destinos (CALIXTO, 2019). Um destes é o isolamento de produtos químicos que apresentam potencial atividade farmacológica, e assim uma vez estabelecida a síntese química do composto a extração vegetal pode ser abandonada, passando-se a utilizar somente o composto sintético. A outra alternativa, é utilizar os produtos naturais como fonte direta de agentes terapêuticos, tanto as plantas inteiras como os extratos padronizados delas. Esta forma de emprego da biodiversidade é referente à produção de fitomedicamentos, também conhecidos como fitoterápicos (CALIXTO, 2019; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010). Esses medicamentos constituem-se em preparações contendo extratos padronizados de uma ou mais plantas, hoje amplamente comercializados. Nesse caso, a atividade biológica ocorre pela ação conjunta dos

diversos princípios farmacologicamente ativos presentes na planta, que em geral são pouco conhecidos (CALIXTO, 2003; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

De acordo com a definição proposta pela ANVISA, o fitoterápico é um produto obtido de matéria-prima ativa vegetal ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples, quando o princípio ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o princípio ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014). No Brasil, o primeiro fitoterápico foi o Acheflan®, um anti-inflamatório tópico desenvolvido a partir da planta medicinal brasileira *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae), aprovado pela ANVISA no ano de 2004 e produzido pela indústria farmacêutica brasileira Aché Laboratórios (CALIXTO, 2005).

Reconhecendo a importância e o uso de produtos naturais, foram criadas políticas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. No Brasil, esta política remonta a partir da Portaria nº. 212 do Ministério da Saúde, de 11 de setembro de 1981, a qual define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Após esta data, políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implantadas, incluindo a Resolução nº. 48/2004 da ANVISA, a qual atualiza a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, feitos anteriormente pela Resolução nº. 17/2000 (BRASIL, 2000, 2004).

No entanto, somente em 2006, o governo brasileiro juntamente com o Ministério da Saúde definiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, oferecendo aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), dentre outras práticas tradicionais a utilização de plantas medicinais e a Fitoterapia (BRASIL, 2006a). A partir desta legislação e em conformidade com orientações da OMS, também em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que de forma geral proporciona a população brasileira o acesso seguro, bem como o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006b).

Em 2011, a ANVISA elaborou o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira por meio da Resolução nº 60, com políticas criadas visando estimular a pesquisa, desenvolvimento e consumo de fitoterápicos. Neste formulário, estão registradas informações sobre a forma correta e padronizada de preparo e restrições de uso de cada espécie. Fornecendo assim, um suporte às práticas de manipulação e dispensação de fitoterápicos nos Programas de Fitoterapia no SUS (BRASIL, 2011a). Destaca-se que neste formulário a oleorresina de Copaíba constitui uma das cinco monografias apresentadas na seção de pomadas. São descritas quatro diferentes espécies, entre elas a *Copaifera langsdorffii* Desf., *Copaifera multijuga* Kuntze, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera paupera*, no qual a oleorresina obtida a partir

destas espécies é indicada para uso como anti-inflamatória, antisséptica e cicatrizante (BRASIL, 2011b).

Das formulações de espécies vegetais e formas farmacêuticas comuns apresentadas neste formulário, fez-se uma seleção para a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2011a). A RENISUS tem a finalidade de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos disponíveis para uso da população e de interesse ao SUS, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. Dentre as 71 espécies citadas, o gênero *Copaifera* também está na lista (BRASIL, 2009).

Além disso, atualmente, está disponível um elenco de 12 plantas medicinais e fitoterápicos, na Relação Nacional de Medicamentos (RENAME) vigente (BRASIL, 2020). Portanto, com o aumento na demanda do mercado consumidor por substâncias de origem natural é importante a avaliação das propriedades bioativas, assim como ensaios farmacológicos e de experimentação clínica que demonstrem a eficácia deste tipo de medicamento e garanta sua segurança em relação à sua possível toxicidade, antes de serem utilizadas pela população. Para que isso ocorra, é necessário a pesquisa científica, buscando conhecer a química, a toxicologia e a farmacologia das plantas medicinais assim como seus constituintes ativos, baseando-se no uso popular das mesmas (CAVINATO et al., 2017; FIRMO et al., 2011).

Neste sentido, constituintes de plantas medicinais contendo grupamentos químicos com propriedades farmacológicas têm sido estudados e avaliados biologicamente, sendo alguns já avaliados no modelo de queimadura de pele induzida pela radiação UVB. *Scutia buxifolia* Reissek (Rhamnaceae), popularmente conhecida no Brasil como “coronilha”, utilizada na medicina popular para diversas condições, incluindo inflamação, apresentou efeitos anti-inflamatórios diminuindo o edema e a infiltração neutrofílica induzida pela irradiação UVB em camundongos (BOLIGON et al., 2016). O estudo com a *Viola tricolor*, confirmou seu uso popular como anti-inflamatório, além de também ter apresentado efeito antinociceptivo após a irradiação UVB em ratos (PIANA et al., 2013). Outro exemplo, é o estudo realizado com o tratamento tópico de *Aloe saponaria* que demonstrou efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e antioxidantes no modelo de queimadura solar em ratos (SILVA et al., 2014).

### 4.3.1 Oleorresina de Copaíba

De fato, ao longo dos anos os produtos naturais representam a principal abordagem para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO et al., 2000). O Brasil como um país tropical apresenta uma biodiversidade muito rica, com mais de 50.000 espécies de plantas (20-22% do total existente no planeta), e produtos oriundos dessas plantas vêm sendo utilizados pela população nativa a muitos anos para o tratamento de diversas doenças agudas e crônicas (CALIXTO, 2019; DUTRA et al., 2016). Neste sentido a oleorresina de Copaíba possui uma importância imensa.

A oleorresina de Copaíba é obtida a partir da exsudação do tronco de árvores de várias espécies do gênero *Copaifera*. Quanto a classificação botânica, *Copaifera* pertence à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinoideae Kunth, seguindo o sistema de Engler (LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). A classificação apenas como Fabaceae também é encontrada em alguns livros e publicações, no entanto, é considerado um nome mais antigo e que deu lugar a Leguminosae (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* são conhecidas popularmente como “copaíba”, “copaibeira”, “copaífera” e “pau-de-óleo”. Etimologicamente, o termo copaíba originou-se do tupi-guarani “cupa-yba”, que significa árvore de depósito, em referência ao óleo armazenado no interior de seu tronco (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As copaíbas são árvores nativas das regiões tropicais da América Latina e também da África Ocidental (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Quanto ao número de espécies, segundo a última edição do Index Kewensis de 1996, existem 72 espécies pertencentes ao gênero *Copaifera*. Por outro lado, mais de 100 diferentes nomes de espécies são encontradas no banco de dados do International Plant Name Index, um plataforma digital que possui a colaboração do Index Kewensis, além de outros, que é continuamente atualizada (ARRUDA et al., 2019).

Diferentes espécies de *Copaifera* podem ser encontradas em todo o mundo, com expressiva ocorrência na América Latina, distribuídas desde o norte da Argentina até o México (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). No Brasil, as copaíbas estão distribuídas por toda extensão territorial, de norte a sul do país, encontradas com maior facilidade na região Amazônica e centro-oeste (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O Brasil é reconhecido pela sua biodiversidade, e nesta incluem-se as espécies do gênero *Copaifera*. A maior riqueza de espécies ocorre no Brasil com 26 espécies e 8 variedades (COSTA, 2020; TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Entre as espécies mais abundantes no

território brasileiro estão, *C. officinalis* L., *C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. reticulata* Ducke, *C. guianensis* Desf., *C. confertiflora* Bth., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke. Dentre estas espécies a *C. langsdorffii* Desf., diferentemente da maioria das outras espécies que ocorre em regiões mais restritas, é distribuída da região norte a sul do Brasil (COSTA, 2020; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As copaíbas são arbustos ou árvores de crescimento lento, que atingem até 40 metros de altura e podem viver por 400 anos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Essas árvores tornaram-se fontes importantes tanto de madeira, como de oleorresina. Esta oleorresina é produzida por canais secretores encontrados em toda árvore, mas principalmente no tronco, sendo um produto de desintoxicação produzido pelas copaíberas, exercendo uma atividade de defesa contra seus predadores, animais, fungos e bactérias (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A oleorresina de Copaíba é um líquido com viscosidade e cor variáveis, variando do amarelo ao marrom claro (LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). A composição fitoquímica da oleorresina de Copaíba obtida de diferentes espécies do gênero *Copaifera*, é principalmente de terpenos, encontrada em duas fases distintas. A fase sólida ou resinosa, não volátil, corresponde aos diterpenos ácidos, que estão dissolvidos na fase volátil do óleo, predominantemente composta por sesquiterpenos (LEANDRO et al., 2012; TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Na fração volátil, os sesquiterpenos podem ser divididos em oxigenados e não oxigenados (CASCON; GILBERT, 2000; GOMES et al., 2008). Portanto, sendo constituída de uma fase resinosa e compostos voláteis a designação correta é de oleorresina de Copaíba, apesar de muitas vezes ser encontrado apenas como óleo de Copaíba ou até mesmo bálsamo de Copaíba (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Na literatura, estão descritos pelo menos 72 sesquiterpenos e 27 diterpenos detectados na oleorresina de Copaíba (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). No entanto, uma extensa e recente análise dos dados da literatura sobre a composição de diferentes espécies de *Copaifera* encontrou entre sesquiterpenos e diterpenos, um total 237 compostos químicos (ARRUDA et al., 2019). Entre os diterpenos mais comumente encontrados na oleorresina de Copaíba de diferentes espécies, estão os ácidos: copálico, poliáltico, hardwíckiico, caurenóico e seus derivados 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxi-copálico e agático. Dentre os principais sesquiterpenos, estão:  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno e  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -bisabolol e Germacrene B (ARRUDA et al., 2019; LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Qualitativamente, diferentes espécies de *Copaifera* podem apresentar uma composição química semelhante, mas destaca-se que variações consideráveis acontecem na concentração da maioria desses compostos dentro da mesma ou de diferentes espécies. Além da espécie do qual a oleorresina de Copaíba é derivada ser um fator importante para sua composição fitoquímica, a constituição da oleorresina também pode ser influenciada por características sazonais e climáticas do ambiente, tipo e composição do solo e índice de precipitação (ARRUDA et al., 2019; LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Embora a composição das oleorresinas apresente variações, em geral, o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno é considerado o principal constituinte da oleorresina de muitas espécies de *Copaifera*, inclusive da espécie *Copaifera officinalis* (LEANDRO et al., 2012; TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Este composto é descrito como responsável por muitas atividades farmacológicas da oleorresina de Copaíba, principalmente aquelas que apresentam efeitos anti-inflamatórios (GOMES et al., 2007; JUNIOR et al., 2007; LEANDRO et al., 2012).

A oleorresina de Copaíba passou a chamar a atenção dos pesquisadores por ser amplamente utilizada na medicina popular. Ela é administrada por via oral ou através da aplicação tópica do óleo *in natura* ou em pomadas, para diversos fins terapêuticos, principalmente como anti-inflamatório, cicatrizante e antimicrobiano (CARVALHO et al., 2005; LEANDRO et al., 2012; MACIEL et al., 2002; PAIVA et al., 2002a).

No entanto, descreve-se que os primeiros relatos do uso da oleorresina de Copaíba foram feitos pelos colonizadores europeus, no século XVI, apesar de nesta época o uso já estar bem difundido pelos índios latino-americanos. A oleorresina era aplicada em locais de ferimentos e no umbigo de recém-nascidos, agindo como anti-inflamatório e cicatrizante. O conhecimento dos indígenas das possíveis propriedades medicinais presentes na oleorresina de Copaíba deu-se por observar o comportamento dos animais, onde estes esfregavam-se nos troncos das copaibeiras para curar suas feridas (MACIEL et al., 2002; VEIGA JR. et al., 2001).

A oleorresina de Copaíba é muito reconhecida e valorizada, principalmente na região Amazônica, região que carece de acesso a produtos farmacêuticos industrializados e à saúde pública (ARRUDA et al., 2019; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Um exemplo é o estado do Pará, onde pessoas de todas as idades e classes sociais consideram a oleorresina de Copaíba uma das fontes medicinais de origem natural mais importantes da região Amazônica (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). A oleorresina de Copaíba possui um uso popular muito amplo, sendo utilizada para o tratamento de doenças de pele, como cicatrizante de úlceras e feridas, para o tratamento de doenças em vias urinárias e respiratórias, entre outras condições (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Assim, entre algumas das indicações etnofarmacológicas da

oleorresina de Copaíba, estão o seu uso como: anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana, antileishmania, inseticida, antiviral, antineoplásica e antinoceptiva (ARRUDA et al., 2019; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Dentro de seus usos populares muitas atribuições já vêm sendo confirmadas por estudos farmacológicos. Os estudos científicos com a oleorresina de Copaíba são importantes por apresentarem dados científicos como base fundamental de uma atividade que possui um uso extensivo na medicina tradicional.

Atualmente, estudos vêm demonstrando que oleorresinas obtidas de plantas do gênero *Copaifera*, apresentam propriedades farmacológicas, como a atividade antinociceptiva observada em modelos de dor induzida pela administração de capsaicina, adjuvante completo de Freund (CFA), ácido acético e formalina (GOMES et al., 2010, 2007; PADILHA et al., 2019). A atividade anti-inflamatória também já foi identificada em diferentes modelos, no qual a oleorresina de Copaíba reduziu o edema (pata ou orelha) induzidos pela administração de formalina, ácido araquidônico, carragenina, bradicinina, histamina e serotonina (GOMES et al., 2010; LUCCA et al., 2017, 2018; PAIVA et al., 2002b; VEIGA JR. et al., 2001). A atividade de cicatrização de feridas da oleorresina de Copaíba também já foi demonstrada em um modelo experimental em ratos, comprovando seu uso tradicional como cicatrizante (PAIVA et al., 2002a; WAGNER et al., 2017). A oleorresina de Copaíba também demonstrou apresentar efeitos antipsoriáticos, por meio da sua potente atividade anti-inflamatória e antioxidante (GELMINI et al., 2013).

A oleorresina de Copaíba também apresenta um extenso uso popular como antimicrobiana, e estudos vêm demonstrando biologicamente esta atividade da oleorresina contra inúmeras bactérias (BARBOSA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2016; MORGUETTE et al., 2019; SANTOS et al., 2008). Efeitos antineoplásicos (GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2003) e tripanocida (KIAN et al., 2018), são alguns outros exemplos de atividades biológicas da oleorresina de Copaíba já avaliadas. A maioria destes efeitos da oleorresina de Copaíba foram observados à partir da sua administração sistêmica, no entanto, altas doses desta oleorresina por via oral já demonstraram apresentar efeitos adversos, como irritação gástrica, diarreia, alterações metabólicas e hepáticas e redução do ganho de peso quando administrada por essa via (BASILE et al., 1988; CASTRO GHIZONI et al., 2017).

Especificamente, estudos com a oleorresina da espécie *Copaifera officinalis* também já evidenciaram algumas atividades farmacológicas, como antinociceptiva (PADILHA et al., 2019), anti-inflamatória (BAYLAC; RACINE, 2003; DIAS et al., 2014) e antimicrobiana (MORGUETTE et al., 2019). O efeito antinociceptivo da oleorresina de *Copaifera officinalis*,

foi observado em um modelo de nocicepção aguda induzida por compostos químicos irritantes, como a capsaicina e o isotiocianato de alila e também em um modelo de dor inflamatória induzida por CFA (PADILHA et al., 2019). A atividade anti-inflamatória da oleorresina de *Copaifera officinalis* já foi evidenciada pela atividade in vitro da oleorresina em inibir a 5-lipoxigenase, uma enzima importante da cascata inflamatória (BAYLAC; RACINE, 2003). Outro exemplo de atividade anti-inflamatória, é o efeito imunomodulador da oleorresina, observada em esplenócitos, células obtidas de camundongos com encefalomielite autoimune experimental. O tratamento das células com a oleorresina de Copaíba inibiu a produção de peróxido de nitrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-17 induzido pelo modelo experimental (DIAS et al., 2014).

Portanto, nós investigamos pela primeira vez, o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da oleorresina de Copaíba oriunda da espécie *Copaifera officinalis* em um modelo de queimadura de pele induzida pela radiação UVB, ainda não avaliado em nenhuma espécie do gênero *Copaifera*. Esperamos que nossos resultados contribuam para o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica ou terapia adjuvante para o tratamento das queimaduras, como aquelas causadas pela radiação solar.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

Journal of Ethnopharmacology 250 (2020) 112476



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Copaiba oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice

Gabriela Becker<sup>a</sup>, Indiara Brusco<sup>a</sup>, Rosana Casoti<sup>b</sup>, Marila Crivellaro Lay Marchiori<sup>c</sup>, Letícia Cruz<sup>c</sup>, Gabriela Trevisan<sup>d</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Neurotoxicity and Psychopharmacology Laboratory, Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo (FCFRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil<sup>c</sup> Laboratory of Pharmaceutical Technology, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>d</sup> Graduate Program in Pharmacology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Copaiba oleoresin  
Sunburn  
Pain  
Inflammation  
 $\beta$ -caryophyllene  
Cell infiltration

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Copaiba oleoresin, extracted from *Copaifera* L., is used as a wound healing, analgesic, antimicrobial and, mainly, anti-inflammatory agent. Thus, in this study we investigated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of a topical formulation containing Copaiba oleoresin (3%) in a UVB radiation-induced skin burn model (0.75 J/cm<sup>2</sup>) in mice and performed a cream-formulation stability study.

**Materials and methods:** The chemical composition of Copaiba oleoresin was analyzed using gas chromatography (GC-MS). The topical antinociceptive (evaluated through mechanical allodynia and thermal hyperalgesia) and the anti-inflammatory (dermal thickness and inflammatory cell infiltration) effects of treatments were assessed. The cream-formulation stability study was performed after two months, and organoleptic characteristics, pH, spreadability and rheological characteristics were analyzed.

**Results:** Copaiba oleoresin cream was able to prevent UVB radiation-induced mechanical allodynia on the 2nd, 3rd and 4th day after UVB radiation exposure with a maximum inhibition ( $I_{max}$ ) of  $64.6 \pm 7\%$  observed on the 2nd day; it also reduced the thermal hyperalgesia on the 1st and 2nd days post UVB radiation, with a  $I_{max}$  of 100% observed on the 2nd day. Moreover, topical treatment with Copaiba oleoresin cream inhibited the inflammatory cell infiltration, but did not reduce the dermal thickness. Such effects can be attributed, at least in part, to the presence of biological components, such as  $\beta$ -caryophyllene and other sesquiterpenes identified by GC-MS.

**Conclusion:** Our results demonstrate that the topical formulation containing Copaiba oleoresin presented antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice subjected to a UVB radiation and that the cream-formulation was stable for two months. Thus, use of Copaiba oleoresin is a promising strategy for the treatment of inflammatory pain associated with sunburn.

## 1. Introduction

The skin is an organ directly exposed to the external environment. Therefore, it is susceptible to continuous external damage (Cavinato et al., 2017; Clydesdale et al., 2001). This type of damage includes ultraviolet (UV) radiation-induced sunburn. In general, burn injuries are a common health problem that affect the global population, and accounting for over 300,000 deaths annually (Koç and Saglam, 2012; WHO, 2008). The prevalence of burns is significantly higher in

developing countries than in developed ones (WHO, 2008). Moreover, in tropical and temperate regions, excessive exposure of the skin to UV radiation is common, and the development of sunburn is favoured in these regions (Lopes and McMahon, 2016). Sunburns are triggered by a combination of UVA (320–400 nm) and UVB (280–320 nm) radiation. The UVB radiation is more energetic and mutagenic than UVA radiation, and it is predominantly responsible for sunburn in humans (Lopes and McMahon, 2016).

The UV radiation-induced sunburns cause the impairment of

\* Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail addresses: [saramarchesan@ufsm.br](mailto:saramarchesan@ufsm.br) (G. Becker), [saramarchesan@hotmail.com](mailto:saramarchesan@hotmail.com), [saramarchesan@ufsm.br](mailto:saramarchesan@ufsm.br) (S.M. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112476>

Received 5 April 2019; Received in revised form 29 November 2019; Accepted 9 December 2019

Available online 12 December 2019

0378-8741/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

cutaneous barrier integrity, photosensitivity, immunosuppression, and skin sensitivity changes in addition to discomfort. They are characterised by the development of an inflammatory process which involves the production of inflammatory mediators, changes in the vascular response including vasodilation, erythema and edema, inflammatory cell infiltration and pain (Baek et al., 2017; Clydesdale et al., 2001; Gustorff et al., 2013; Lopes and McMahon, 2016; Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

Pain is the most frequent and relevant symptom reported during the acute and rehabilitation phase in patients with burn injuries (Boluda Pérez et al., 2016; Summer et al., 2007). Moreover, severe burns can cause direct nerve damage causing neuropathic pain (Colloca et al., 2017; McIntyre et al., 2016). This kind of pain is resistant to treatment and decreases the patients' quality of life (McIntyre et al., 2016). The development of more effective treatments to treat burn-related pain is relevant (Kaul et al., 2018). Also, it has been shown that untreated sunburn-induced pain and inflammation contribute to sensory problems, which may occur long-term, and include chronic pain, paresthesia, and dysesthesias and debilitating psychological conditions (Summer et al., 2007).

Usually, therapy for the treatment of burn patients is the silver sulfadiazine, an antimicrobial agent used topically to relieve pain and avoid possible wound infections (Atiyeh et al., 2006). However, its use is associated with several adverse effects (agranulocytosis, leukopenia, hemolytic anaemia) that limit its use (Fuller, 2009; Miller et al., 2012). Silver sulfadiazine can cause local effects including cell cytotoxicity, delayed wound healing, hypertrophic or atrophic scars, and lead to the development of hypersensitivity reactions, allergic contact dermatitis, erythema multiforme and blue-grey pigmentation (Atiyeh et al., 2006; Fisher et al., 2003; García et al., 2016; Khorasani et al., 2009). In addition to silver sulfadiazine, acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs or corticoids are also used as analgesics (Faurschou and Wulf, 2008), which also cause adverse effects that limit their use (Barkin, 2015; Süleyman et al., 2007). Thus, the search for new, safe and effective treatments is necessary, and natural products with topical anti-inflammatory and analgesic effects to treat sunburn have the potential to act as alternatives to currently used therapeutics (Piana et al., 2013; Silva et al., 2014).

Copaiba oleoresin is obtained from the trunk of several *Copaifera* species (Caesalpinaceae) of native trees broadly distributed in Latin America (Basile et al., 1988; Leandro et al., 2012). Oleoresin is widely used in folk medicine for several therapeutic purposes, including anti-inflammatory and wound healing agent, and antimicrobial (Basile et al., 1988; Carvalho et al., 2005; Leandro et al., 2012; Paiva et al., 2002a). In this sense, studies have previously demonstrated that Copaiba oleoresin, including *Copaifera officinalis* L., possesses pharmacological properties, which include antinociceptive (Dalenogare et al., 2019; Gomes et al., 2010, 2007), anti-inflammatory (Gomes et al., 2010; Junior et al., 2007; Lucca et al., 2017, 2018; Paiva et al., 2002b; Veiga, Zunino, Calixto, Patitucci & Pinto, 2001), antimicrobial (Barbosa et al., 2018; Guimarães et al., 2016; Santos et al., 2008), wound healing activity (Paiva et al., 2002a; Wagner et al., 2017) effects, and others (Gelmini et al., 2013; Gomes et al., 2008; Lima et al., 2003).

The phytochemical composition of Copaiba oleoresin varies depending on the species from which it is derived. It mainly consists of sesquiterpenes and diterpenes (Leandro et al., 2012; Veiga Jr. et al., 2001). However, the  $\beta$ -caryophyllene is considered the principal constituent of oleoresin from some *Copaifera* species, which are responsible for many pharmacological activities of Copaiba oleoresin, especially those which display anti-inflammatory effects (Gomes et al., 2007; Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012).

Due to the vast use the Copaiba oleoresin in folk medicine and the wide range of diseases treated with the substance, the goal of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of topical treatment with Copaiba oleoresin incorporated in a cream

formulation in a UVB radiation-induced burn model in mice. We also assessed the chemical composition of Copaiba oleoresin, and the stability cream formulation containing Copaiba oleoresin to ensure its efficiency and quality throughout the study.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

*Copaifera officinalis* oleoresin was obtained by ADV Farma (Tayuuna Laboratory Ltda; Nova Odessa, Brazil). *n*-Hexane was purchased from the Merck. Lanette N<sup>o</sup>, silver sulfadiazine, imidazolidinyl urea, parabens, and propylene glycol was obtained by Delaware. All experimental reagents, if not specified, were purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

### 2.2. GC-MS analysis

Commercial Copaiba oleoresin (50  $\mu$ L) was solubilized in *n*-hexane (950  $\mu$ L). This sample was analyzed by GC-MS on a Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) system equipped with an AOC-20i autosampler operating in the electron ionization (EI) mode at 70 eV under the following conditions: Rtx-5MS (Shimadzu) fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m film thickness) composed of 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane; carrier gas helium (99.999%) at a constant flow of 1.3 mL/min; sample injection volume of 0.1  $\mu$ L (split ratio of 1:5); injector temperature 250  $^{\circ}$ C; ion-source temperature 250  $^{\circ}$ C. The oven temperature was programmed to increase from 60 to 160  $^{\circ}$ C at 0–32 min, 160–300  $^{\circ}$ C at 32–44 min and 300  $^{\circ}$ C at 44–65 min. Mass spectra were recorded with a scan interval of 0.5 s within the mass range 10–700 Da. The identification of the Copaiba oleoresin components was based on their retention indices, relative to a homologous series of *n*-alkanes (C8–C20) measured on an Rtx-5MS capillary column under the same operating conditions. Computer matching was accomplished with the aid of the Wiley 7, NIST 11 and FFNSC1.3 spectra libraries. The mass spectra of the constituents were also compared to those reported in the literature (Adams, 2007).

### 2.3. Preparation of Copaiba oleoresin cream

The cream formulation containing Copaiba oleoresin was obtained by the emulsification of two phases immiscible stabilized by an anionic surfactant. The aqueous phase consisted of the propylparaben and methylparaben solutions in propylene glycol and distilled water. The oil phase consisted of Lanette N<sup>o</sup> wax and Copaiba oleoresin. The aqueous phase was heated to 70  $^{\circ}$ C, and then it was poured over the oil phase which was at 65  $^{\circ}$ C. After the cooling (40  $^{\circ}$ C), it was added the imidazolidinyl urea solution to the cream obtained (Table 1). The base cream (without oil) was employed in the vehicle group. For silver sulfadiazine cream preparation, the drug was dispersed in propylene glycol and added on the cream. The concentration of Copaiba oleoresin 3% used in our study was based on previous studies, where extracts in a 3% concentration were used for the burn injury treatment (Deuschle et al., 2018; Piana et al., 2013).

**Table 1**  
Composition of the Copaiba oleoresin cream.

Components	Amount (%)
<sup>1</sup> Lanette N <sup>o</sup>	10.0
<sup>2</sup> Copaiba oleoresin	3.0
<sup>2</sup> Paraben solutions in propylene glycol	1.0
<sup>2</sup> Water	q.s.p.
<sup>2</sup> Imidazolidinyl urea aqueous solution	0.3

(1) Oil phase; (2) Aqueous phase (3) Complementary phase.

## 2.4. Stability evaluation

Copaiba oleoresin cream, silver sulfadiazine cream, and base cream were packaged in the double-walled polyethylene bottles and were stored at room temperature, under the protection of light during 2 months. The stability evaluation of the samples was carried using the following evaluation parameters: organoleptic tests, pH, spreadability and rheology. These parameters were performed immediately after samples preparation and at 1 and 2 months.

### 2.4.1. Evaluation of the organoleptic characteristics

The organoleptic characteristics of the semisolid formulations studied were evaluated in relation to possible color, smell and appearance changes. The samples were evaluated at the same temperature, lighting and packaging conditions.

### 2.4.2. pH determination

The pH values were evaluated in formulation aqueous dispersion (10%, w/v). After the homogenization process, the pH measurements of the samples were performed at  $25 \pm 5$  °C using a potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) (Fialho et al., 2017; Piana et al., 2013).

### 2.4.3. Determination of spreading capacity

The spreadability was evaluated according to the methodology described by Rigo et al. (2012). The sample was positioned on a scanner surface (HP Office jet, model 4500 Desktop) with the help of a glass mold plate, and it was subsequently pressed with glass plates of known weights in intervals of 1 min between each plate. The spreading area images were captured by the desktop scanner and were calculated in millimeters ( $\text{mm}^2$ ) using the software ImageJ (Version 1.49q, National Institutes of Health, USA). The results were expressed in terms of spreadability factor (Sf) which represents the formulation spreading capacity on a smooth horizontal surface when 1 g of weight is added to it. The following equation was employed to calculate the Sf:

$$Sf = A/W$$

in which Sf is the spreadability factor ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ), A is the spread area ( $\text{mm}^2$ ) after addition of the total number of plates, and W is the total weight added (g).

### 2.4.4. Rheological study

The rheological study was carried out at  $25 \pm 1$  °C employing a rotational viscometer (RVDV-1-PRIME model, Brook-field, USA) with an RV06 spindle. The samples were submitted to a range of speed between 2 and 100 rpm. The data were analyzed by using different models: Bingham (eq. (1)), Casson (eq. (2)) and Ostwald (eq. (3)), employing the graphical model to determine the rheological behavior (Pegoraro et al., 2017).

$$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5} \dot{\gamma}^{0.5} \quad (2)$$

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

where,  $\tau_0$  is the yield stress,  $\eta$  is the viscosity, n is the index of flow, K is the index of consistency,  $\tau$  is the shear stress and  $\dot{\gamma}$  is the shear rate.

## 2.5. In vivo study

### 2.5.1. Animals

The experiments were performed using male Swiss mice (25–30 g), kept in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2$  °C) under a 12 h/12 h light-dark cycle, with free access to food and water. The animals were habituated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. The experimental protocol was approved by the Institutional

Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (Process number 4575250917/2017) and was performed in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The experiments also followed the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) and the Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (McGrath and Lilley, 2015). Moreover, the experiments were carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). The number of animals and the intensity of stimuli used was the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatments, and the evaluation was performed blindly with respect to drug administration.

### 2.6. UVB radiation-induced skin burn model

The UVB radiation-induced burn model was performed as described previously (Piana et al., 2013). The UVB radiation source consisted of a Philips TL40W lamp (Medical-Eindhoven, Holland) that emitted a continuous light spectrum between 270 and 400 nm with an emission peak at 313 nm, mounted at a distance of 12 cm above the animals. The UVB radiation rate used was of  $0.61 \text{ mW}/\text{cm}^2$  and the dose of  $0.75 \text{ J}/\text{cm}^2$  that is correspondent to 3 MED (minimal erythemal dose) in the clinical practice (Bishop et al., 2007; Lopes and McMahon, 2016). UVB output (80% of the total UV radiation) was measured using a radiometer sensor for UV (UV monitor MS-211-1, EKO Instruments, Japan). In order, to performed the UVB radiation-induced burn, the animals were anaesthetized via intraperitoneal with ketamine (90 mg/kg, i.p.) plus xylazine (3 mg/kg, i.p.). Then only the right hind paw of anaesthetized animals was exposed to UVB radiation until reach the dose of  $0.75 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Treatments were applied immediately after the irradiation in the still anaesthetized mice.

#### 2.6.1. Treatments administration

First, the baseline mechanical and thermal paw withdrawal threshold was measured. Then, the animals were anaesthetized and submitted to the UVB radiation-induced burn model. Immediately after irradiation, anaesthetized mice were treated with base cream (15 mg/paw; vehicle), Copaiba oleoresin cream (3%, 15 mg/paw) or silver sulfadiazine (1%, 15 mg/paw; used as a positive control). These treatments were performed once a day for 6 consecutive days in anaesthetized mice. A control group was submitted to UVB radiation but untreated (irradiated group) and another group was non-irradiated untreated (naïve group). The mechanical allodynia was measured every day (days 1, 2, 3, 4, 5 and 6), and thermal hyperalgesia was measured until the 5th day after irradiation. These measurements were always evaluated 24 h after treatments and before the anaesthesia. After allodynia and hyperalgesia measurements were finalized, the mice were anaesthetized and the topical treatment newly applied. Histological analysis and dermis thickness were evaluated on the 6th day after UVB irradiation.

## 2.7. Nociceptive parameters

### 2.7.1. Evaluation of mechanical allodynia

The mechanical allodynia was evaluated using the up-and-down paradigm as previously described (Chaplan et al., 1994). Mice were individually acclimatized in clear Plexiglas boxes (7 x 9 x 11 cm) on an elevated wire mesh platform, to allow access to the plantar surface of the right hind paw, where filaments of von Frey of increasing stiffness (0.02–10 g) were applied with a pressure causing the filament to bend. The absence of a paw lifting response after 5s led to the use of the next

filament with increasing weight, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements or until four consecutive positive or negative responses. The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was expressed in grams (g) and measured before UVB radiation (baseline; B) and in several times after the irradiation and treatments (from 1 up to 6 days) (Dixon, 1980). A significant decrease in the PWT compared to the baseline values was considered as mechanical allodynia (Oliveira et al., 2016b).

### 2.7.2. Assessment of thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was measured as the paw withdrawal reaction to a heat stimulus as previously described (Hargreaves et al., 1988). A radiant thermal stimulus from a 60 W light bulb was projected into the right hind paw of animals and the paw withdrawal latency was then evaluated before the irradiation (baseline; B) and from 1 up to 5 days after the UVB radiation and topical treatments. To prevent damage to the plantar tissue, the maximum time of exposition to the thermal font was of 20 s. The thermal hyperalgesia was considered as a significant decrease in the paw withdrawal threshold when compared with the baseline values. The results were expressed as latency for paw withdrawal in seconds (s) (Oliveira et al., 2016b).

### 2.8.1. Histological analysis

To verify the histological changes in the plantar tissue and the edema development, the mice treated with base cream, Copaiba oleoresin cream (3%) or silver sulfadiazine (1%) were euthanized at 6 days after UVB radiation-induced skin burn for the collection of the right hind paw samples. Samples of the irradiated untreated group and the naïve group also were collected. The paw tissue was then fixed in an alfac solution (16:2:1 mixture of 80% ethanol, 40% formaldehyde and 5% acetic acid). Each sample was embedded in paraffin wax, sectioned at 5  $\mu$ m and stained with hematoxylin-eosin. The histological slides images were obtained using an optical microscope at 40 x increments and the inflammatory cells number and the dermis thickness was quantified using the ImageJ software (Camponogara et al., 2019; Oliveira et al., 2011).

### 2.9. Statistical analysis

The results are expressed as the mean + standard error of the mean (SEM). The maximum inhibitory effect was calculated based on the control group (irradiated) response. All data were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, using Graph Pad Prism 6.0 software (San Diego California, USA). The inflammatory cells count was performed using ImageJ software. The data of the mechanical threshold were log transformed before analysis to meet the parametric assumptions.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. GC-MS analysis

The chemical composition of the Copaiba oleoresin identified by GC-MS is shown in Table 2. A total of 22 sesquiterpenes were identified, whose major constituent was described as  $\beta$ -caryophyllene (60.17%), besides  $\alpha$ -humulene (10.38%) and  $\alpha$ -copaene (4.39%) (Fig. 1).

### 3.2. Stability study

#### 3.2.1. Organoleptic characteristics

All formulations appeared macroscopically homogeneous and milky. The results of the organoleptic tests in the stability study showed

Table 2

Chemical composition of the *Copaifera officinalis* commercial oleoresin by GC-MS.

Nº	Compound	CAS	SI (%)	RT (min)	RA (%)	RI <sub>c</sub>	RI <sub>lit</sub>
1	$\delta$ -Elemene	20307-84-0	94	19.87	0.59	1337.26	1335
2	$\alpha$ -Cubebene	17699-14-8	92	20.38	0.34	1349.42	1351
3	$\alpha$ -Copaene	3856-25-5	94	21.47	4.39	1375.79	1376
4	$\beta$ -Elemene	515-13-9	95	22.14	0.96	1391.93	1390
5	$\beta$ -Caryophyllene	87-44-5	94	23.38	60.17	1422.51	1419
6	$\gamma$ -Elemene	29873-99-2	92	23.82	0.19	1433.46	1436
7	$\alpha$ -trans-Bergamotene	13474-59-4	95	23.93	3.5	1436.07	1434
8	$\alpha$ -Humulene	6753-98-6	95	24.64	10.38	1453.86	1454
9	9- <i>epi</i> - $\beta$ -Caryophyllene	68832-35-9	93	24.91	0.25	1460.57	1466
10	$\gamma$ -Murolene	30021-74-0	95	25.56	1.51	1476.62	1479
11	Germacrene D	23986-74-5	91	25.72	2.5	1480.72	1481
12	$\beta$ -Selinene	17066-67-0	91	25.91	0.72	1485.32	1490
13	$\alpha$ -Bulnesene	3691-11-0	92	26.28	0.39	1494.53	1490
14	$\alpha$ -Murolene	10208-80-7	96	26.50	0.23	1500.12	1500
15	$\beta$ -Bisabolene	495-61-4	93	26.83	1.35	1508.59	1505
16	$\gamma$ -Cadinene	39029-41-9	93	27.03	0.38	1513.8	1513
17	$\delta$ -Cadinene	483-76-1	94	27.41	2.08	1523.7	1523
18	Germacrene B	15423-57-1	94	28.67	1.09	1556.64	1559
19	$\beta$ -Caryophyllene alcohol	56747-96-7	95	29.16	1.08	1569.4	1575
20	$\beta$ -Caryophyllene oxide	1139-30-6	92	29.67	2.92	1582.68	1583
21	Humulene epoxide II	19888-34-7	93	30.66	0.28	1608.89	1608
22	$\alpha$ -Murolol	19435-97-3	93	32.05	0.58	1638.19	1646

Note: CAS: chemical abstracts service; SI: similarity index based to Wiley 7, NIST 11 and FFNSCI.3 spectral libraries; RT: retention time; RA: relative area; RI<sub>c</sub>: calculated retention index and RI<sub>lit</sub>: Retention index from the literature.

no relevant changes in color, smell, and appearance of the Copaiba oleoresin cream 3%, in the three evaluated times (0, 1, and 2 months).

### 3.2.2. pH and spreadability determination

The pH values for all formulations were in the acid range. In relation to the spreadability, the  $S_f$  values ranged between  $2.85 \pm 1.65$  and  $6.79 \pm 1.12 \text{ mm}^2/\text{g}$  (Table 3).

### 3.2.3. Rheological behavior

The rheological evaluation indicated a non-Newtonian flow for all creams (Fig. 2). In mathematical modeling, the best fit was in the Ostwald equation for all formulations, which demonstrated pseudo-plastic flows (Table 4). Flow index (n) and consistency index (K) were also established (Table 5). In all creams, the parameters analyzed remained unchanged throughout the storage time (2 months).

### 3.3. In vivo study

#### 3.3.1. Copaiba oleoresin cream reduces the UVB radiation-induced mechanical allodynia

Mice exposed to UVB radiation but untreated developed mechanical allodynia, which was characterized by a reduction in the PWT in response to a mechanical stimulus of von Frey filaments. Mechanical allodynia was observed from 1 up to 6 days after the UVB radiation when compared to the naïve group (Fig. 3). The topical treatment with Copaiba oleoresin cream (3%) or silver sulfadiazine (1%; positive control) was able to reduce the mechanical allodynia on the 2nd, 3rd and 4th days after the UVB radiation when compared to the irradiated group. The maximal inhibition ( $I_{\text{max}}$ ) observed was of  $64.6 \pm 7\%$  for Copaiba oleoresin cream on the 2nd day and  $62.7 \pm 7\%$  for silver sulfadiazine on the 3rd days after UVB irradiation. In addition, the base cream also reduced the mechanical allodynia just on the 3rd day after UVB radiation when compared to the irradiated group, with  $I_{\text{max}}$  of

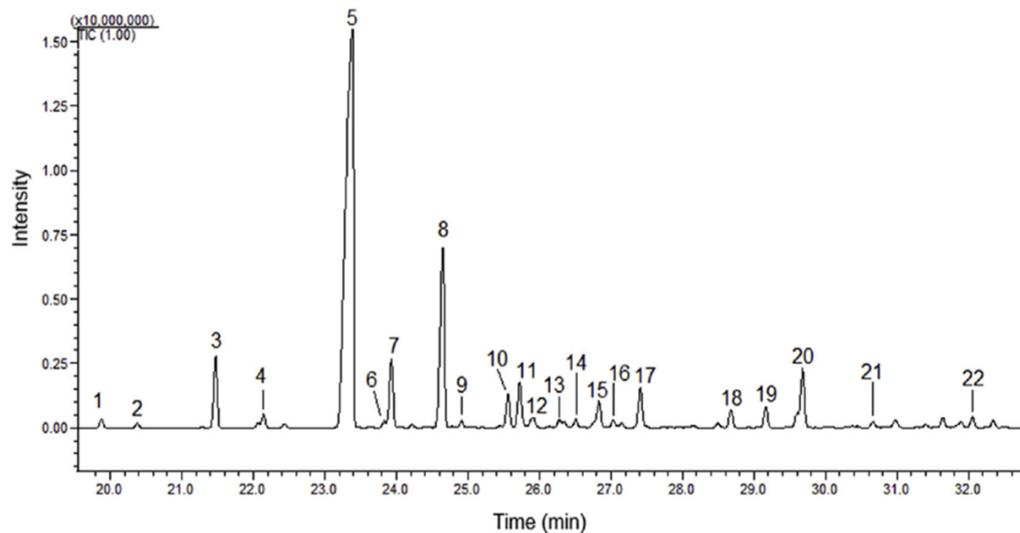


Fig. 1. GC-MS profile of *Copaifera officinalis* commercial oleoresin. Peaks identification is reported in Table 1.

57.8 ± 17% (Fig. 3).

### 3.3.2. *Copaiba oleoresin cream reduces the UVB radiation-induced thermal hyperalgesia*

Firstly, we observed that the UVB radiation decreased the paw withdrawal latency of animals from 1 up to 2 days after the UVB radiation, when compared to the group naïve, characterizing the development of thermal hyperalgesia. The topical treatment with the *Copaiba oleoresin cream* (3%) reduced the thermal hyperalgesia on the 1st and 2nd days after the UVB radiation with  $I_{max}$  of 100%, on the 2nd day. Moreover, the silver sulfadiazine (1%; used as a positive control) and base cream were also effective in reducing thermal hyperalgesia on the 2nd day after the UVB radiation with  $I_{max}$  of 73.88 ± 12% and 94.5 ± 14%, respectively (Fig. 4).

### 3.3.3. *Copaiba oleoresin cream reduces the UVB radiation-induced cell infiltration*

Histological analysis was conducted to evaluate the dermal thickness and the infiltration of inflammatory cells in the paw tissue of the mice submitted to the UVB radiation. The UVB radiation caused an increase of the inflammatory cells infiltration in the paw tissue (144.2 ± 13 polymorphonuclear cells per field) when compared to the naïve group (95.7 ± 6 polymorphonuclear cells per field). The topical treatment with *Copaiba oleoresin cream* (3%), base cream and silver sulfadiazine (1%) was able to reduce the number of inflammatory cells in the paw tissue (101.7 ± 5; 102.0 ± 7 and 110.3 ± 6 polymorphonuclear cells per field, respectively) when compared to the irradiated group (Fig. 5). The UVB radiation also promoted an increase in the dermal thickness of mice' paws. On the other hand, just silver sulfadiazine (1%), but not *Copaiba oleoresin* (3%) cream, was able to reduce this increase when compared to the irradiated group.

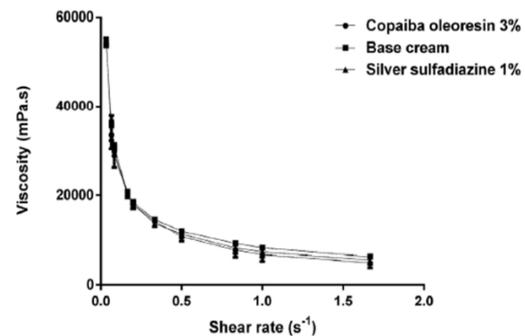


Fig. 2. Rheological behavior of the semisolid formulations, after preparation.

Table 4

Regression coefficient ( $r$ ) for various flow mathematical models ( $n = 3$ , mean ± SD).

	Copaiba oleoresin 3%	Base cream	Silver sulfadiazine 1%
Ostwald	0.996 ± 0.003	0.993 ± 0.007	0.992 ± 0.008
Casson	0.988 ± 0.003	0.984 ± 0.008	0.983 ± 0.009
Bingham	0.964 ± 0.007	0.975 ± 0.001	0.966 ± 0.016

## 4. Discussion

Interest in natural medicine has been growing around the world. This interest has been linked to an increasing concern within the population with issues related both to life quality and appearance (Cavinato et al., 2017). Natural products are used worldwide, but principally in developing countries, for the treatment of different diseases. Based on their popular uses, these products are becoming an

pH and  $S_f$  values of the cream formulations ( $n = 3$ , mean ± SD), after the preparation (0, 1 and 2 months).

Formulations Months:	pH			$S_f$ (mm <sup>2</sup> /g)		
	0	1	2	0	1	2
Copaiba oleoresin 3%	5.72 ± 0.55	4.46 ± 0.22	4.98 ± 0.02	4.80 ± 1.46	5.06 ± 0.62	5.72 ± 0.34
Silver sulfadiazine 1%	5.26 ± 0.64	5.25 ± 0.22	4.93 ± 0.11	4.12 ± 0.87	6.79 ± 1.12	6.03 ± 1.89
Base cream	6.07 ± 0.36	5.28 ± 0.25	5.19 ± 0.19	4.41 ± 2.19	2.85 ± 1.65	5.70 ± 0.80

Table 5

Flow index (n) and consistency index (K) of semisolid formulations, according to Ostwald flow model, after the preparation (0, 1, and 2 months) (n = 3, mean ± SD).

Formulations Months:	K (mPa.s)			n		
	0	1	2	0	1	2
Copaiba oleoresin 3%	130.26 ± 3.51	135.65 ± 8.94	130.88 ± 1.22	0.44 ± 0.01	0.41 ± 0.00	0.42 ± 0.00
Silver sulfadiazine 1%	128.42 ± 8.29	132.76 ± 0.72	133.72 ± 4.84	0.45 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.46 ± 0.02
Base cream	126.03 ± 9.43	130.90 ± 0.93	130.92 ± 2.97	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0.00	0.48 ± 0.01

important resource for research focused on uncovering new drugs (KoeHN and Carter, 2005; Pratheeshkumar et al., 2012). Copaiba oleoresin, obtained from several species of the genus *Copaifera*, has been used in folk medicine for many years, mainly by the populations of the north and northeast of Brazil. The remedy has diverse therapeutic purposes, especially as an anti-inflammatory agent (Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012) a wound-healing topical agent (Paiva et al., 2002a; Wagner et al., 2017), an antinociceptive (Gomes et al., 2007) and an antioxidant (Castro Ghizoni et al., 2017). In Brazil, Copaiba oleoresin has been commercialised in its crude oil form and is a constituent of several pharmaceutical and cosmetic products (Gomes et al., 2007; Sousa et al., 2011). Here, we have shown that topical treatment with the Copaiba oleoresin cream reduced nociceptive (mechanical allodynia and thermal hyperalgesia) and inflammatory parameters (cells infiltration) in a UVB radiation-induced skin burn model. These results confirm its traditional use as an anti-inflammatory (Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012) and antinociceptive agent that have previously been reported (Carvalho et al., 2005; Dalenogare et al., 2019; Gomes et al., 2010, 2007).

We investigated the antinociceptive and anti-inflammatory potential of Copaiba oleoresin in a UVB radiation-induced skin burn model, since burn injuries are a common health problem characterised mainly by inflammatory and painful symptoms (Clydesdale et al., 2001; Koç and Saglam, 2012; Lopes and McMahon, 2016). Painful burn symptoms include allodynia (pain in response to innocuous stimulus) and hyperalgesia (increased pain response to painful stimulus) (Loeser and Treede, 2008; Bishop et al., 2009). Our study showed that UVB radiation induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in mice. These results are in accordance with previous findings (Deuschle et al., 2018; Piana et al., 2013). We chose the UVB radiation-induced sunburn model because it is a useful tool that has been widely used in inflammatory pain study and it is one of the few pre-clinical models that allow for the confident transition from animal to clinical study (Bishop et al., 2007; Lopes and McMahon, 2016). Copaiba oleoresin cream was able to reduce UVB radiation-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. These results are relevant since, with patients

experiencing sunburn, pain is the main complaint reported (Lopes and McMahon, 2016). Treatment of burn-associated pain has been considered a principal unmet medical need, which requires the development of therapeutic agents of increased effectiveness (Summer et al., 2007).

The antinociceptive effect of topical treatment with Copaiba oleoresin cream is consistent with previous data (Carvalho et al., 2005), which showed that topical application of this oleoresin produces antinociceptive activity in an acute inflammatory pain model. Moreover, the oral administration of Copaiba oleoresin has also shown peripheral and central antinociceptive effects in pain models, such as in the acetic acid-induced abdominal constriction, formalin and tail flick tests (Gomes et al., 2010, 2007). The antinociceptive activity of Copaiba oleoresin in these studies were attributed to its anti-inflammatory effect (Carvalho et al., 2005) and interactions with opioid receptors (Gomes et al., 2010, 2007; Dalenogare et al., 2019). However, high doses of oral Copaiba oleoresin may cause several adverse effects including gastric irritation, diarrhea, sialorrhea, central nervous system depression, metabolic and liver changes, and body weight gain reduction when administered systemically (Basile et al., 1988; Castro Ghizoni et al., 2017). Since Copaiba oleoresin was applied topically, antinociceptive and anti-inflammatory effects shown in this study have great relevance.

Skin burns cause local tissue damage characterised by a painful inflammation (Bishop et al., 2009), and alters vascular permeability and inflammatory cells infiltration to injured tissues (Clydesdale et al., 2001). We showed that the UVB radiation induced inflammatory cell infiltration in paw tissue, which was reduced by topical treatment with Copaiba oleoresin cream. On the other hand, Copaiba oleoresin cream did not reduce UVB-induced increases in dermal thickness. Previous studies have shown anti-edematogenic activity for orally administered Copaiba oleoresin using other models including paw edema induced by carrageenan (Basile et al., 1988), bradykinin (Veiga Jr. et al., 2001; Junior et al., 2006), histamine or serotonin (Gomes et al., 2010). The discrepancy between our results and those found regarding the anti-edematogenic effects of Copaiba oleoresin may have occurred as a result of different routes of administration used. When administered

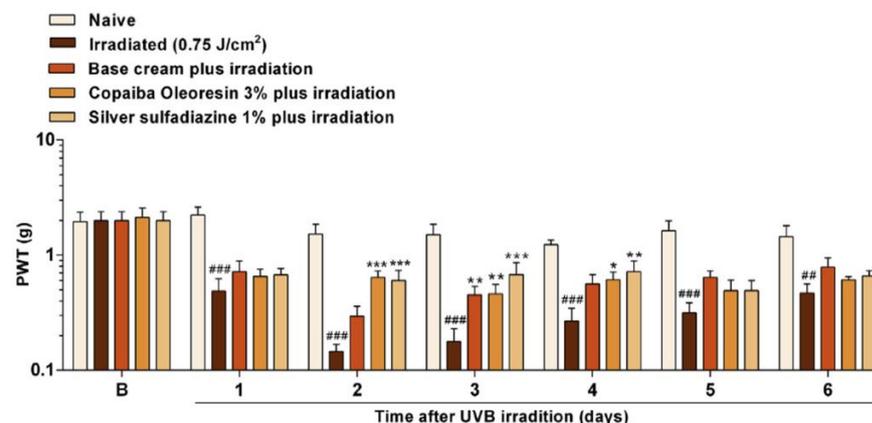


Fig. 3. Time-response curve for the antinociceptive effect of Copaiba oleoresin cream (3%; 15 mg/paw), base cream (15 mg/paw) or silver sulfadiazine (1%; 15 mg/paw) on the UVB radiation-induced mechanical allodynia from 1 up to 6 days after UVB radiation. Data are presented as the mean ± SEM (n = 6 animals per group). <sup>##</sup>P < 0.01; <sup>###</sup>P < 0.001 when compared to the naive group. <sup>\*</sup>P < 0.05; <sup>\*\*</sup>P < 0.01 and <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 when compared to the irradiated group (Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). PWT means Paw Withdrawal Threshold.

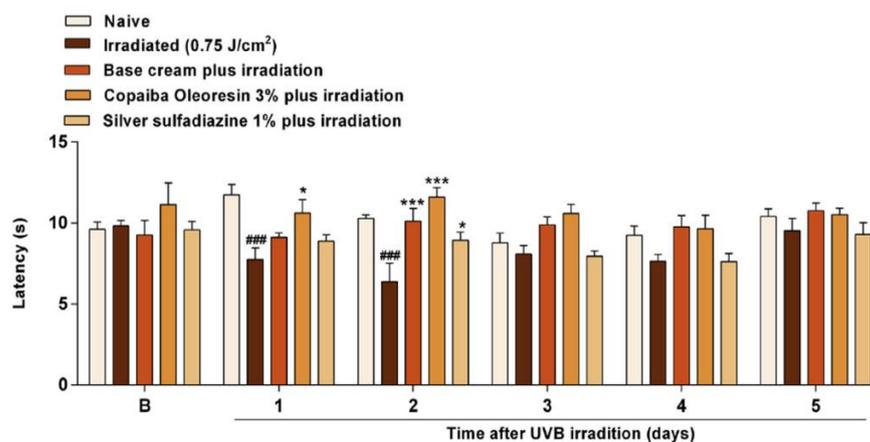


Fig. 4. Time-response curve for the antihyperalgesic effect of Copaiba oleoresin cream (3%; 15 mg/paw), base cream (15 mg/paw), or silver sulfadiazine (1%; 15 mg/paw) on the UVB radiation-induced thermal hyperalgesia from 1 up to 5 days after UVB radiation. Data are presented as the mean + SEM (n = 6 animals per group). ###P < 0.001 when compared to the naive group. \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 when compared to the irradiated group (Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

topically, the Copaiba oleoresin cream seems to lack antiedematogenic effects, since it was not able to reduce UVB radiation-induced edema formation. Our results are in accordance with those reported by Lucca et al. (2018), who showed that topical Copaiba oleoresin treatment did not alter formalin-induced paw edema. Although Copaiba oleoresin has not been effective in reducing edema, it was able to reduce the number of infiltrating inflammatory cells, which is in agreement with results obtained by Teixeira et al. (2017) who assessed the effects of another species of *Copaifera* in an inflammation model.

It is important to note that the effect of the Copaiba oleoresin in reducing infiltration of inflammatory cells is relevant since these cells can promote the secretion of cytokines and chemotactic chemokines, which amplifies the inflammatory process (Oliveira et al., 2016a). After a tissue injury occurs, resident inflammatory cells are activated, which release inflammatory mediators and promote the recruitment more inflammatory cells to the lesion site. This results in the amplification of the inflammatory response and can become chronic (Chiu et al., 2012; S. Oliveira et al., 2016a). The reduction of an inflammatory parameter may indirectly contribute to the antinociceptive activity of Copaiba oleoresin, since UVB-induced burn causes inflammatory pain in response to both the tissue injury and the subsequent inflammatory response (Bishop et al., 2009; Costigan et al., 2009). Moreover, another important effect from Copaiba oleoresin cream is the healing properties of Copaiba (Paiva et al., 2002a; Wagner et al., 2017), which can contribute to reduce the inflammatory process and enhance the antinociceptive effects.

These pharmacological effects caused by Copaiba oleoresin are likely associated with the presence of active compounds within the substance (Deuschle et al., 2018; Fialho et al., 2017; Fischer et al., 2017). Copaiba oleoresins are comprised of a mixture of sesquiterpenes and diterpenes, and 90% of the total composition of the oleoresins are attributed to sesquiterpenes (hydrocarbon and oxygenated compounds), followed of acidic diterpenes (Sousa et al., 2011; Veiga Junior and Pinto, 2002). Several studies shown that the major compound found in the oleoresins of most species of *Copaifera* is the sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene (Dias et al., 2014; Gomes et al., 2007; Sousa et al., 2011; Veiga Jr. et al., 2001). The identification of active compounds is important for providing researchers with a means to understand the biological effects of the natural product. In addition, it is important characterise the chemical composition of the oleoresin used in this study to ensure that the Copaiba oleoresin used belongs to the species *Copaifera officinalis*. In our study, the chemical composition of the oleoresin was assessed using GC-MS. We were able to confirm that *Copaifera officinalis* oleoresin was used in our study and it was primarily composed of  $\beta$ -caryophyllene (60.17). Other compounds present in significant quantities within Copaiba oleoresin were the  $\alpha$ -humulene

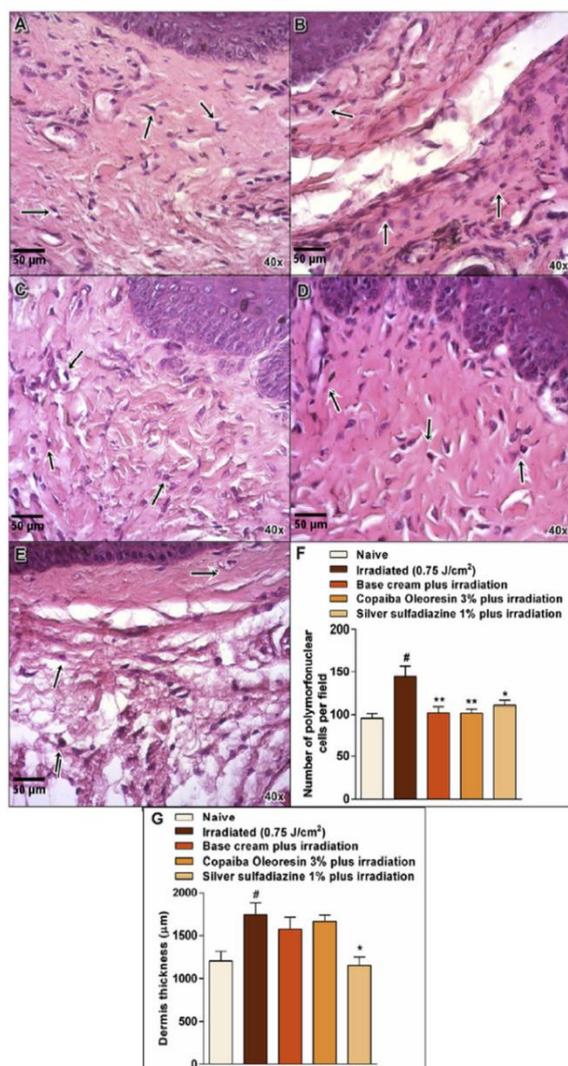
(10.38%),  $\alpha$ -copaene (4.39%) and  $\alpha$ -trans-Bergamotene (3.5%). These results are in accordance with previous studies in which these sesquiterpenes were identified in other samples of Copaiba oleoresins (Cascon and Gilbert, 2000; Lucca et al., 2018).

$\beta$ -caryophyllene is a naturally bicyclic sesquiterpene that is present in a large number of plants including *Piper nigrum* L., *Cinnamomum* spp., *Cannabis sativa* L., *Ocimum* spp., *Rosmarinus officinalis*. The compound is the principal active component of many essential oils (Fidyt et al., 2016). Anti-inflammatory, analgesic, anti-carcinogenic, and antioxidant activities have previously been attributed to  $\beta$ -caryophyllene (Fidyt et al., 2016; Gertsch et al., 2008; Sousa et al., 2011). Moreover, according to Dias et al. (2014),  $\beta$ -caryophyllene is a likely candidate for the main anti-inflammatory compound in Copaiba oleoresin. Previous results have also shown that  $\beta$ -caryophyllene presents antinociceptive effects in acute and chronic pain models in mice, and this action has been mediated by opioid and endocannabinoid systems (Paula-Freire et al., 2014). Further,  $\beta$ -caryophyllene has shown antigenotoxic and antioxidant activities against UVB-induced damage (Fuentes et al., 2017). Since the Copaiba oleoresin used in this study is rich in  $\beta$ -caryophyllene the antinociceptive and anti-inflammatory effects may be attributed to the presence of this compound.

The silver sulfadiazine, used as a positive control in our study, has been the standard topical therapy used to treat patients with burn injuries. It is mainly used as a result of its antimicrobial activity (Atiyeh et al., 2006; Khorasani et al., 2009). Similar to Copaiba oleoresin, treatment with silver sulfadiazine (1%) reduced the UVB radiation-induced nociceptive and inflammatory parameters. These results are in accordance with activities already reported for silver sulfadiazine in this same model (Deuschle et al., 2018; Piana et al., 2013). The similar efficacy observed for Copaiba oleoresin and silver sulfadiazine may be due to similarities in the properties of both substances (Piana et al., 2013), since studies have already shown that Copaiba oleoresin has antimicrobial activity similar to silver sulfadiazine (Santos et al., 2008).

We observed that the base cream, although to a lesser extent, also slightly reduced nociceptive and inflammatory parameters that were induced by UVB radiation. Ultraviolet radiation compromises epidermal barrier integrity as a result of the loss of transepidermal water and consequent reductions in stratum corneum hydration (Liu et al., 2010). Thus, the effects of the base cream may have been provided as a result of its emollient action which restricts the evaporation of water from the skin via semi-occlusive effects (Kucharekova et al., 2002).

To ensure the effectiveness and quality of the cream formulation containing Copaiba oleoresin, we performed a preliminary stability study. All formulations presented adequate characteristics, and pH values, rheology, and spreadability were compatible to cutaneous application (Flores et al., 2015; Marchiori et al., 2017; Schmid-Wendtner and



**Fig. 5.** Effect of Copaiba oleoresin cream (3%), base cream (15 mg/paw) or silver sulfadiazine (1%) on inflammatory cells infiltration in the mice' paw at 6 days after the UVB radiation-induced skin burn (A–E). The figure captions represent: (A) Naive; (B) Irradiated; (C) Copaiba oleoresin cream 3%; (D) Base cream; (E) Silver sulfadiazine 1%. Quantification of polymorphonuclear cells per field (F) of the paw tissue of mice. Scale bar, 50 μm. Effect of the positive control, silver sulfadiazine (1%) in the dermis thickness reduction (G). Data are presented as the mean + SEM (n = 6 animals per group). The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the paw tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared to the naïve or irradiated group. <sup>#</sup>P < 0.05 when compared to the naïve group; <sup>\*</sup>P < 0.05; <sup>\*\*</sup>P < 0.01 when compared to the irradiated group (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

Korting, 2006). Further, all cream formulations showed satisfactory organoleptic characteristics after oleoresin incorporation, which were maintained over time. The pH values determined were close to the physiological pH of the skin, meaning that they were slightly acidic, which is suitable for creams used for the topical administration of treatment (Schmid-Wendtner and Korting, 2006). In addition to preventing the proliferation of pathogenic microorganisms, the acid pH of the skin surface is important for ensuring its barrier function, because several key enzymes involved in the synthesis and maintenance of the skin barrier have an optimum pH in the range of 4.5–5.6 (Ali and

Yosipovitch, 2013).

The *Sf* values found in our study also are in agreement with the previous data regarding the spreadability of semisolid skin formulations (Flores et al., 2015; Marchiori et al., 2017; Pegoraro et al., 2017). *Sf* demonstrates how many mm<sup>2</sup> the formulation spreads when 1 g weight is applied, which indicates the degree to which creams spread on the skin after they are applied. It is an important parameter that is necessary for ensuring that the correct dosage is applied to the target site (Rigo et al., 2012).

Rheological properties of formulations that define non-Newtonian fluid behaviour are characterised by viscosity decreases as the shear rate increases. Non-Newtonian fluids can be classified in the following categories: plastic, pseudoplastic and dilatant. Mathematical modeling by Bingham, Casson, and Ostwald helped us to understand the rheology of different non-Newtonian systems (Chhabra and Richardson, 2008). The Ostwald model, which describes pseudoplastic flow, was the best fit for oleoresin formulations, providing regression coefficients higher than 0.99. Pseudoplastic flow behaviour was confirmed by the *n* value < 1 for all the samples. To compare formulation consistencies, *K* values were calculated. All semisolids presented a similar *K* value that was unchanged over the time stored. The pseudoplastic behaviour observed for the formulations had interesting implications for topical administration, since the semisolid formulation may become less viscous when a pressure is applied, facilitating dose distribution in the treated area (Chhabra and Richardson, 2008; Rigo et al., 2015). Thus, this preliminary stability study indicated that the components of the formulation were an adequate vehicle for Copaiba oleoresin and that the formulations were suitable for *in vivo* evaluation. No statistical difference was observed between pH, rheological characteristics and the spreadability of cream formulations, meaning that differences in these characteristics were unlikely to influence *in vivo* performance.

## 5. Conclusion

Our findings suggest that Copaiba oleoresin may be used topically for the treatment of pain associated with inflammatory processes including those caused by sunburn, since the cream formulation containing this oleoresin presented antinociceptive and anti-inflammatory effects on a UVB radiation-induced skin burn model. This effect can be attributed to the presence of β-caryophyllene within the formulation, which is highly effective in reducing inflammatory processes. Moreover, the Copaiba oleoresin cream formulation presented favourable characteristics for cutaneous application, ensuring its therapeutic effects and quality.

## Author contribution

Participated in research design: GB, IB, SMO. Conducted experiments: GB, IB, SMO. Copaiba oleoresin cream preparation, stability study, data analyses, writing and discussion of these: MCLM, LC. GC-MS analyses: RC. Performed data analysis: GB, IB, SMO. Wrote or contributed to the writing of the manuscript: GB, IB, RC, MCLM, SMO. All the authors reviewed the manuscript.

## Compliance with ethical standards

### Ethical approval

All procedures performed were in accordance with international and national and were approved by Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (process number 4575250917/2017).

## Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq [Grant #16/2551-0000281-9]; and by FAPERGS [Grant #17/2551-0001082-5] (Brazil); and by the CNPq [process #406098/2018-2]; and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/PROEX [#23038.004173/2019-93; Grant 0493/2019]. SMO and GB are recipients of fellowship from CNPq [process #307220/2017-6] and [process #132171/2019-8], respectively, and IB is recipient of fellowship from CAPES/PROEX [process #88882.182148/2018-01]. We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

## References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- Ali, S.M., Yosipovitch, G., 2013. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm. Venereol.* 93, 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>.
- Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S.A., 2006. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 33, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.010>.
- Baek, J.Y., Park, S., Park, J., Jang, J.Y., Wang, S. Bin, Kim, S.R., Woo, H.A., Lim, K.M., Chang, T.S., 2017. Protective role of mitochondrial peroxiredoxin III against UVB-induced apoptosis of epidermal keratinocytes. *J. Investig. Dermatol.* 137, 1333–1342. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.01.027>.
- Barbosa, A.L.P., WenzelWenzel-Storjohann, A., Barbosa, J.D., Zidorn, C., Peifer, C., Tasdemir, D., Çiçek, S.S., 2018. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids Anna. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.029>.
- Barkin, R.L., 2015. Topical nonsteroidal anti-inflammatory Drugs: the importance of drug delivery, and therapeutic outcome. *Am. J. Therapeut.* 22, 388–407.
- Basile, A.C., Sertíé, J.A.A., Freitas, P.C.D., Zanini, A.C., 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *J. Ethnopharmacol.* 22, 101–109.
- Bishop, T., Hewson, D.W., Yip, P.K., Fahey, M.S., Dawbarn, D., Young, A.R., McMahon, S.B., 2007. Characterisation of ultraviolet-B-induced inflammation as a model of hyperalgesia in the rat. *Pain* 131, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.12.014>.
- Bishop, T., Ballard, A., Holmes, H., Young, A.R., McMahon, S.B., 2009. Ultraviolet-B induced inflammation of human skin: characterisation and comparison with traditional models of hyperalgesia. *Eur. J. Pain* 13, 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.06.006>.
- Boluda Pérez, M.T., Morales Asencio, J.M., Carrera Vela, A., García Mayor, S., León Campos, A., López Leiva, I., Rengel Díaz, C., Kaknani-Uttumchandani, S., 2016. The dynamic experience of pain in burn patients: a phenomenological study. *Burns* 42, 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.03.008>.
- Camponogara, C., Silva, C.R., Brusco, I., Piana, M., Faccin, H., de Carvalho, L.M., Schuch, A., Trevisan, G., Oliveira, S.M., 2019. *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- $\kappa$ B pathways without causing toxicological effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 229, 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.011>.
- Carvalho, J.C.T., Cascon, V., Possebom, L.S., Morimoto, M.S.S., Cardoso, L.G.V., Kaplan, M.A.C., Gilbert, B., 2005. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother. Res.* 19, 946–950. <https://doi.org/10.1002/ptr.1762>.
- Cascon, V., Gilbert, B., 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55, 773–778. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00284-3).
- Castro Ghizoni, C.V., Arsuñi Ames, A.P., Lameira, O.A., Bersani Amado, C.A., Sá Nakanishi, A.B., Bracht, L., Marçal Natali, M.R., Peralta, R.M., Bracht, A., Comar, J.F., 2017. Anti-inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *J. Cell. Biochem.* 118, 3409–3423. <https://doi.org/10.1002/jcb.25998>.
- Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C.V.C., Stuppner, H., Jansen-Dürr, P., 2017. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology* 18, 499–516. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9715-7>.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
- Chhabra, R.P., Richardson, J.F., 2008. Non-Newtonian flow and applied rheology, second ed. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Chiu, I.M., von Hehn, C.A., Woolf, C.J., 2012. Neurogenic inflammation – the peripheral nervous system's role in host defense and immunopathology. *Nat. Neurosci.* 15, 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nn.3144>.
- Clydesdale, G.J., Dandridge, G.W., Muller, H., 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79, 547–568.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 1–45. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J., 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 1–32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.
- Dalengare, D.P., Ferro, R.P., De Prá, S.D.T., Rigo, F.K., Caren Tatiane de David, Antoniazzi, Almeida, A.S., Damiani, A.P., Strapazzon, G., de Sardinha, T.T., Galvani, C.N., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., Trevisan, G., 2019. Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. *Inflammopharmacology* 27, 829–844. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00588-3>.
- Deuschle, V.C.K.N., Brusco, I., Piana, M., Faccin, H., de Carvalho, L.M., Oliveira, S.M., Viana, C., 2018. *Persea Americana* Mill. Crude Extract Exhibits Antinociceptive Effect on UVB Radiation-Induced Skin Injury in Mice. *Inflammopharmacology.* <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0441-9>.
- Dias, D.S., Fontes, L.B.A., Crotti, A.E.M., Aarestrup, B.J.V., Aarestrup, F.M., Ademar, A., Filho, S., Corrêa, J.O.A., 2014. Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57BL/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Molecules* 19, 12814–12826. <https://doi.org/10.3390/molecules190812814>.
- Dixon, W.J., 1980. Experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462.
- Faurschou, A., Wulf, H.C., 2008. Topical corticosteroids in the treatment of acute sunburn: A randomized, double-blind clinical trial. *Arch. Dermatol.* 144, 620–624.
- Fialho, M.F.P., Brusco, I., da Silva Brum, E., Piana, M., Boligon, A.A., Trevisan, G., Oliveira, S.M., 2017. *Buddleja thyrsoides* Lam. crude extract presents antinociceptive effect on an arthritic pain model in mice. *Biochem. J.* 474, 2993–3010. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170008>.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., Szumny, A., 2016. B-caryophyllene and B-caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.* 5, 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>.
- Fischer, S.P.M., Brusco, I., Camponogara, C., Piana, M., Faccin, H., Gobo, L.A., de Carvalho, L.M., Oliveira, S.M., 2017. Arctium minus crude extract presents antinociceptive effect in a mice acute gut attack model. *Inflammopharmacology* 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0384-6>.
- Fisher, N.M., Marsh, E., Lazova, R., 2003. Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 730–732. [https://doi.org/10.1067/S0190-9622\(02\)61574-9](https://doi.org/10.1067/S0190-9622(02)61574-9).
- Flores, F.C., de Lima, J.A., da Silva, C.R., Benvegnú, D., Ferreira, J., Burger, M.E., Beck, R.C.R., Rolim, C.M.B., Rocha, M.L.U.M., da Veiga, M.L., da Silva, C.D.B., 2015. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide anti-edematogenic effect and improved skin wound healing. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 800–809. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9176>.
- Fuentes, J.L., García Forero, A., Quintero Ruiz, N., Prada Medina, C.A., Rey Castellanos, N., Franco Niño, D.A., Contreras García, D.A., Córdoba Campo, Y., Stashenko, E.E., 2017. The SOS Chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 1424–1434. <https://doi.org/10.1039/C7PP00024C>.
- Fuller, F.W., 2009. The side effects of silver sulfadiazine. *J. Burn Care Res.* 30, 464–470. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181a28c9b>.
- García, A.A., Martín, A.M.R., Baldrich, E.S., Mercade, E.M., Sanz, L.P., 2016. Allergic contact dermatitis to silver in a patient treated with silver sulphadiazine after a burn. *Editor. Euro. Acad. Dermatol. Venereol.* 30, 365–366. <https://doi.org/10.1111/jdv.12783>.
- Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., Cavalchini, A., Maffei, R., 2013. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antispasmodic effect. *Int. J. Pharm.* 440, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.021>.
- Gerstsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Altmann, K.-H., Karsak, M., Zimmer, A., 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>.
- Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., 2007. Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.* 109, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.018>.
- de Matos Gomes, Niele, de Moraes Rezende, Claudia, Fontes, S.P., Hovell, A.M.C., Landgraf, R.G., Eline Matheus, Maria, da Cunha Pinto, Angelo, Fernandes, P.D., 2008. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *J. Ethnopharmacol.* 119, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.033>.
- de Matos Gomes, Niele, de Moraes Rezende, Claudia, Fontes, S.P., Eline Matheus, Maria, Pinto, A. da C., Fernandes, P.D., 2010. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *J. Ethnopharmacol.* 128, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.005>.
- Guimarães, A.L., Cunha, E.A., Matias, F.O., Garcia, P.G., Danopoulos, P., Swikidisa, R., Pinheiro, V.A., Nogueira, R.J., 2016. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera officinalis*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) oils against *Staphylococcus aureus*: importance in compounding for wound care. *Int. J. Pharm. Compd.* 1, 59–62.
- Gustorff, B., Sycha, T., Lieba-Samal, D., Rolke, R., Treede, R.D., Magerl, W., 2013. The pattern and time course of somatosensory changes in the human UVB sunburn model reveal the presence of peripheral and central sensitization. *Pain* 154, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.12.020>.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception. *Pain* 32, 77–88.
- Júnior, V.F.V., Zunino, L., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., Calisto, J.B., 2006. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1405–1410. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.11.0015>.
- Júnior, V.F.V., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C., 2007.

- 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. *J. Ethnopharmacol.* 112, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005>.
- Kaul, I., Amin, A., Rosenberg, M., Rosenberg, L., Meyer, W.J., 2018. Use of gabapentin and pregabalin for pruritus and neuropathic pain associated with major burn injury: a retrospective chart review. *Burns* 44, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2017.07.018>.
- Khorasani, G., Hosseini, S.J., Azadbakht, M., Zamani, A., Mahdavi, M.R., 2009. Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: a randomized controlled study. *Surg. Today* 39, 587–591. <https://doi.org/10.1007/s00595-008-3944-y>.
- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206–220. <https://doi.org/10.1038/nrd1657>.
- Koç, Z., Saglam, Z., 2012. Burn epidemiology and cost of medication in paediatric burn patients. *Burns* 38, 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.03.011>.
- Kucharekova, M., Schalkwijk, J., Van de Kerkhof, P.C.M., Van de Valk, P.G.M., 2002. Effect of a lipid-rich emollient containing ceramide 3 in experimentally induced skin barrier dysfunction. *Contact Dermatit.* 46, 331–338. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.460603.x>.
- Leandro, L.M., De Sousa Vargas, F., Barbosa, P.C.S., Neves, J.K.O., Da Silva, J.A., Da Veiga-Junior, V.F., 2012. Chemistry and biological activities of terpenoids from *Copaifera* spp. oleoresins. *Molecules* 17, 3866–3889. <https://doi.org/10.3390/molecules17043866>.
- Lima, S.R.M., Veiga, V.F., Christo, H.B., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytother. Res.* 17, 1048–1053. <https://doi.org/10.1002/ptr.1295>.
- Liu, Z., Fluhr, J.W., Song, S.P., Sun, Z., Wang, H., Shi, Y.J., Elias, P.M., Man, M.Q., 2010. Sun-Induced changes in stratum corneum function are gender and dose dependent in a Chinese population. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 313–319. <https://doi.org/10.1159/000314138>.
- Loeser, J.D., Treede, R.D., 2008. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 137, 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>.
- Lopes, D.M., McMahon, S.B., 2016. Ultraviolet radiation on the skin: a painful experience? *CNS Neurosci. Ther.* 22, 118–126. <https://doi.org/10.1111/cns.12444>.
- Lucca, L.G., Matos, S.P., Mattos, Cristiane B., Teixeira, Helder F., Limberger, Renata P., Veiga, V.F., Araújo, B.V., Koester, L.S., 2017. Nanoemulsification potentiates in vivo anti-edematogenic effect of copaiba oil. *J. Biomed. Nanotechnol.* 13 (8), 583–590.
- Lucca, L.G., de Matos, S.P., Kreutz, T., Teixeira, H.F., Veiga, V.F., de Araújo, B.V., Limberger, R.P., Koester, L.S., 2018. Anti-inflammatory effect from a hydrogel containing nanoemulsified copaiba oil (*Copaifera multijuga* hayne). *AAPS PharmSciTech* 522–530. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0862-6>.
- Marchiori, M.C.L., Rigon, C., Camponogara, C., Oliveira, S.M., Cruz, L., 2017. Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 170, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.015>.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N., 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.019>.
- McGrath, J.C., Lilley, E., 2015. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP. Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193. <https://doi.org/10.1111/bph.12955>.
- McIntyre, M.K., Clifford, J.L., Maani, C.V., Burmeister, D.M., 2016. Progress of clinical practice on the management of burn-associated pain: lessons from animal models. *Burns* 42, 1161–1172.
- Miller, A.C., Rashid, R.M., Falzon, L., Elamin, E.M., Zehtabchi, S., 2012. Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, e159–e165. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.014>.
- Oliveira, S.M., Drewes, C.C., Silva, C.R., Trevisan, G., Boschen, S.L., Moreira, C.G., De Almeida Cabrini, D., Da Cunha, C., Ferreira, J., 2011. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.* 672, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.001>.
- Oliveira, S., Rosowski, E.E., Huttenlocher, A., 2016a. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 378–391. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.49>.
- Oliveira, S.M., Silva, C.R., Trevisan, G., Villarinho, J.G., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Borges, M.H., Jr, C.J.C., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2016b. Antinociceptive effect of a novel armed spider peptide Tx3-5 in pathological pain models in mice. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 881–894. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1801-1>.
- Paiva, L.A.F., De Alencar Cunha, K.M., Santos, F.A., Gramosa, N.V., Silveira, E.R., Rao, V.S.N., 2002a. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother. Res.* 16, 737–739. <https://doi.org/10.1002/ptr.1049>.
- Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., Silva, R.M., Tomé, A.R., Gramosa, N.V., Silveira, E.R., Santos, F.A., Rao, V.S.N., 2002b. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vasc. Pharmacol.* 39, 303–307. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00028-4).
- Paula-Freire, L.L.G., Andersen, M.L., Gama, V.S., Molska, G.R., Carlini, E.L.A., 2014. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine* 21, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.006>.
- Pegoraro, N.S., Barbieri, A.V., Camponogara, C., Mattiazzi, J., Brum, E.S., Marchiori, M.C.L., Oliveira, S.M., Cruz, L., 2017. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 150, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>.
- Piana, M., Silva, M.A., Trevisan, G., De Brum, T.F., Silva, C.R., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., Zadra, M., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Tonello, R., Laporta, L.V., De Freitas, R.B., Belke, B.V., Da Silva Jesus, R., Ferreira, J., Athayde, M.L., 2013. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *J. Ethnopharmacol.* 150, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.040>.
- Pratheeshkumar, P., Sreekala, C., Zhang, Z., Budhraj, A., Ding, S., Son, Y., Wang, X., Hitron, A., Hyun-Jung, K., Wang, L., Lee, J., Shi, X., 2012. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 10, 1159–1184.
- Rigo, L.A., Weber, J., da Silva, C.B., Beck, R.C.R., 2012. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. *Lat. Am. J. Pharm.* 31, 1387–1391.
- Rigo, L.A., Da Silva, C.R., De Oliveira, S.M., Cabreira, T.N., De Bona Da Silva, C., Ferreira, J., Beck, R.C.R., 2015. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.020>.
- Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V., 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 277–281. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>.
- Schmid-Wendtner, M.H., Korting, H.C., 2006. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19, 296–302. <https://doi.org/10.1159/000094670>.
- Silva, M.A., Trevisan, G., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Boligon, A.A., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., Oliveira, S.M., Silva, C.R., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2014. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 133, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.019>.
- Sousa, J.P.B., Brancalion, A.P.S., Souza, A.B., Turatti, L.C.C., Ambrósio, S.R., Furtado, N.A.J.C., Lopes, N.P., Bastos, J.K., 2011. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.006>.
- Süleyman, H., Demircan, B., Karagöz, Y., 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 59, 247–258.
- Summer, G.J., Puntillo, K.A., Miaskowski, C., Green, P.G., Levine, J.D., 2007. Burn injury pain: the continuing challenge. *J. Pain* 8, 533–548. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.02.426>.
- Veiga Jr., V.F., Zunino, L., Calixto, J.B., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., 2001. Phytochemical and antiedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytother. Res.* 15, 476–480.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., 2002. O gênero *Copaifera* L. *Quím. Nova* 25, 273–286.
- Wagner, V.P., Webber, L.P., Ortiz, L., Rados, P.V., Meurer, L., Lameira, O.A., Lima, R.R., Martins, M.D., 2017. Effects of copaiba oil topical administration on oral wound healing. *Phytother. Res.* 6–11. <https://doi.org/10.1002/ptr.5845>.
- WHO, A., 2008. WHO Plan for Burn Prevention and Care. World Health Organization.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

## 6 CONCLUSÃO

A radiação UVB causa danos agudos e crônicos à pele, resultando em uma ampla resposta inflamatória, com conseqüente desenvolvimento de dor associada à queimadura solar (BISHOP et al., 2010). Os tratamentos disponíveis para tratar queimaduras estão associados a inúmeros efeitos adversos o que torna urgente e necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para melhor tratá-la. Levando em consideração o uso popular da oleorresina de Copaíba, especialmente sobre processos nociceptivos e inflamatórios, e a ausência de estudos sobre a administração cutânea da oleorresina incorporada em uma formulação, esta poderia ser uma opção inovadora para o tratamento de lesões cutâneas induzidas pelos raios UV.

Em nosso estudo, a aplicação cutânea da formulação creme contendo a oleorresina de Copaíba apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de queimadura de pele induzida pela radiação UVB. Seus efeitos frente a estímulos mecânico e térmico, foram semelhantes aos observados pela sulfadiazina de prata (1%). No entanto, vale ressaltar que acreditamos que o uso tópico da oleorresina de Copaíba cause uma menor ou nenhuma ocorrência de efeitos adversos, uma vez que, até o momento, a oleorresina de Copaíba somente causou efeitos indesejados após o seu uso em altas doses por via oral (BASILE et al., 1988; CASTRO GHIZONI et al., 2017), características que diferem das empregadas neste estudo.

Além disso, semelhante ao que acontece durante processo inflamatório instalado após um dano tecidual (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017), o modelo de queimadura induzido pela radiação UVB também resultou na infiltração de células inflamatórias e no aumento espessura dérmica no tecido plantar dos camundongos. O uso do creme contendo oleorresina de Copaíba foi suficientemente efetivo em reduzir o infiltrado leucocitário para o local da lesão. Este efeito anti-inflamatório pode estar contribuindo para a ação antinociceptiva, pois conseqüentemente com a redução do número de células, haverá uma menor liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão causada pela queimadura. Desta forma, acreditamos que esse mecanismo também esteja envolvido com a redução da hipersensibilidade observada após a aplicação cutânea do creme oleorresina de Copaíba.

Portanto, nossos resultados indicam que a radiação UVB per se ou em cooperação com outros mediadores inflamatórios (células inflamatórias) podem estar promovendo o desenvolvimento de dor inflamatória em um modelo de queimadura solar induzida pela radiação UVB. Podemos assim sugerir que o uso da oleorresina de Copaíba pode ser uma

estratégia promissora interessante para o tratamento ou terapia adjuvante da dor e inflamação associadas às queimaduras.

## **7 PERSPECTIVAS**

7.1 Avaliar a infiltração de células inflamatórias no tecido plantar de camundongos após a irradiação UVB através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a fim de corroborar com o resultado obtido a partir da análise histológica;

7.2 Avaliar os níveis de citocinas inflamatórias no tecido plantar dos camundongos após irradiação UVB;

7.3 Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do composto majoritário presente nesta oleorresina de Copaíba,  $\beta$ -cariofileno, no modelo de queimadura induzido pela radiação UVB;

7.4 Para reforçar o potencial biológico da oleorresina de Copaíba utilizada, investigar seu potencial antioxidante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; ORAZIO, J. A. D. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. **Molecules**, v. 19, p. 6202–6219, 2014.
- ANGST, M. S. et al. Cytokine profile in human skin in response to experimental inflammation, noxious stimulation, and administration of a COX-inhibitor: A microdialysis study. **Pain**, v. 139, n. 1, p. 15–27, 2008.
- ARRUDA, C. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 1–20, 2019.
- ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, v. 33, n. 2, p. 139–148, 2006.
- AYDEDE, M.; SHRIVER, A. Recently introduced definition of “nociplastic pain” by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. **Pain**, v. 159, n. 6, p. 1176–1177, 2018.
- BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity : implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, p. 433–447, 2019.
- BARBOSA, A. L. P. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, abr. 2018.
- BARNES, P. W. et al. Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 7, p. 569–579, 2019.
- BARON, E. D.; SUGGS, A. K. Introduction to photobiology. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 255–266, 2014.
- BARRETT, L. W. et al. Understanding acute burn injury as a chronic disease. **Burns & Trauma**, v. 7, p. 1–9, 2019.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BASILE, A. C. . et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101–109, 1988.
- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 2003.
- BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: Bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, v. 71, n. 3, p. 217–221, 2008.
- BENARROCH, E. E. Ion channels in nociceptors. **Neurology**, v. 84, n. 11, p. 1153–1164, 2015.

BENNETT, D. L. H.; WOODS, C. G. Painful and painless channelopathies. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 6, p. 587–599, 2014.

BINGHAM, B. et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, n. 1, p. 28–37, 2009.

BISHOP, T. et al. Characterisation of ultraviolet-B-induced inflammation as a model of hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 131, n. 1–2, p. 70–82, 2007.

BISHOP, T. et al. Ultraviolet-B induced inflammation of human skin: Characterisation and comparison with traditional models of hyperalgesia. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 5, p. 524–532, 2009.

BISHOP, T. et al. Ultraviolet-B-induced mechanical hyperalgesia: A role for peripheral sensitisation. **Pain**, v. 150, n. 1, p. 141–152, 2010.

BOLUDA PÉREZ, M. T. et al. The dynamic experience of pain in burn patients: A phenomenological study. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 1097–1104, 2016.

BOURINET, E. et al. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 81–140, 2014.

BOWLER, P. G. et al. Microbicidal Properties of a Silver-Containing Hydrofiber Dressing Against a Variety of Burn Wound Pathogens. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 25, n. 2, p. 192–196, 2004.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 fev. 2000.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e revoga a RDC n. 17/2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Dispõe sobre a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 mai. 2006.

BRASIL. Presidência da República, Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **Ministério da Saúde**, 2011a.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 60, de 8 de novembro de 2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da

Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2011.

BRASIL. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 26, de 8 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial**, Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020 – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2020.

BULLER, D. B. et al. Prevalence of sunburn, sun protection, and indoor tanning behaviors among Americans: Review from national surveys and case studies of 3 states. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 5, p. S114.e1-S114.e11, 2011.

CALIXTO, B. et al. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. v. 418, n. October 1999, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Biodiversidade**, v. 200, p. 37–39, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1–7, 2019.

CARLINO, E.; FRISALDI, E.; BENEDETTI, F. Pain and the context. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 6, p. 348–355, 2014.

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, 2000.

CASTRO GHIZONI, C. V. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 10, p. 3409–3423, 2017.

CAVINATO, M. et al. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 499–516, 2017.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063–1067, 2012.

CHURCH, D. et al. Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p.

403–434, 2006.

CITRON, I. et al. Assessing burn care in Brazil: An epidemiologic, cross-sectional, nationwide study. **Surgery (United States)**, v. 163, n. 5, p. 1165–1172, 2018.

CLAUW, D. J. Fibromyalgia and related conditions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 5, p. 680–692, 2015.

CLYDESDALE, G. J. .; DANDIE, G. W. .; MULLER, H. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. **Immunology and Cell Biology**, v. 79, p. 547–568, 2001.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–20, 2017.  
COSTA, J. A. S. **Copaifera**. In **Flora do Brasil 2020, em Construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 1–32, 2009.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DAUBER, A. et al. Chronic persistent pain after severe burns: A survey of 358 burn survivors. **Pain Medicine**, v. 3, n. 1, p. 6–17, 2002.

DAWES, J. M. et al. CXCL5 mediates UVB irradiation-induced pain. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 90, 2011.

DIAS, D. S. et al. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57Bl/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, p. 12814–12826, 2014.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors : the sensors of the pain pathway Find the latest version : Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EDWARDS, R. R. et al. Symptoms of depression and anxiety as unique predictors of pain-related outcomes following burn injury. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 34, n. 3, p. 313–322, 2007.

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777–783, 2010.

FAURSCHOU, A.; WULF, H. C. Topical corticosteroids in the treatment of acute sunburn: A randomized, double-blind clinical trial. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 5, p. 620–624, 2008.

FIELDS, H. L.; MALICK, A.; BURSTEIN, R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, n. 4, p. 1742–1759, 1995.

FIRMO, W. DA C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq**, v. 18, p. 90–95, 2011.

FISHER, N. M.; MARSH, E.; LAZOVA, R. Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. p. 730–732, 2003.

FULLER, F. W. The Side Effects of Silver Sulfadiazine. **Journal of Burn Care & Research**, v. 30, n. 3, p. 464–470, 2009.

GELMINI, F. et al. GC – MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf . and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 170–178, 2013.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248–1257, 2010.

GOMES, N. DE M. et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179–184, 2008.

GOMES, N. DE M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2010.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 486–492, 2007.

GRACE, P. M. . et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, 28 abr. 2014.

GRAY, P.; WILLIAMS, B.; CRAMOND, T. Successful use of gabapentin in acute pain management following burn injury: A case series. **Pain Medicine**, v. 9, n. 3, p. 371–376, 2008.

GUIMARÃES, A. L. et al. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. **Int J Pharm Compd.**, v. 1, p. 59–62, 2016.

HAACK, R. L.; HORTA, B. L.; CESAR, J. A. Queimadura solar em jovens : estudo de base populacional no Sul do Brasil Sunburn in young people : population-based study in Southern. v. 42, n. 1, p. 26–33, 2008.

HAN, A.; MAIBACH, H. I. Management of acute sunburn. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2004.

HARRISON, G. I.; YOUNG, A. R.; MCMAHON, S. B. Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation as a Model for Cutaneous Hyperalgesia. **Journal of Investigative Dermatology**,

v. 122, n. 1, p. 183–189, 2004.

HOLFELD, T. ; SAXENA, A.; SCHOR, K. High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance. **Thrombosis and haemostasis**, v. 109, n. 5, p. 825–33, 2013.

**IASP. IASP Terminology; Nociceptive Pain.**

**INDEX, I. P. N. The plant list, Copaifera. International Plant Name Index.**

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, 2018.

JAMES, S. L. et al. Epidemiology of injuries from fire, heat and hot substances: Global, regional and national morbidity and mortality estimates from the Global Burden of Disease 2017 study. **Injury Prevention**, v. 26, p. i36–i45, 2020.

JESCHKE, M. G. et al. Burn injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1–25, 2020.

JII, R.-R. et al. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. **Anesthesiology**, n. Xxx, p. 1–24, 2018.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 20 jun. 2001.

JUNIOR, V. F. V. et al. 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**, v. 112, p. 248–254, 2007.

KADDOURA, I. et al. Burn injury: review of pathophysiology and therapeutic modalities in major burns. **Annals of burns and fire disasters**, v. 30, n. 2, p. 95–102, 2017.

**KEWENSIS, I. Clarendon Press: Oxford, 1996.** [s.l: s.n.].

KHORASANI, G. et al. Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: A randomized controlled study. **Surgery Today**, v. 39, p. 587–591, 2009.

KIAN, D. et al. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. November 2017, p. 1294–1301, 2018.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496–511, 2011.

KOÇ, Z.; SAGLAM, Z. Burn epidemiology and cost of medication in paediatric burn patients. **Burns**, v. 38, n. 6, p. 813–819, 2012.

KOSEK, E. et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**, v. 157, n. 7, p. 1382–1386, 2016.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20–30, 2017.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.

LIEBEL, F. et al. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1901–1907, 2012.

LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing, in the treatment of burn wounds El uso de piel de ti. **Rev Bras Queimaduras.**, v. 16, n. 1, p. 10–17, 2017.

LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 2019, n. 6, p. 1–4, 2019.

LIMA JÚNIOR, E. M. et al. Innovative Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft: A Phase II Randomized Controlled Trial. **Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association**, v. 41, n. 3, p. 585–592, 2020.

LIMA, S. R. M. et al. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LOPES, D. M.; MCMAHON, S. B. Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 118–126, 2016.

LUCAS, R. M. et al. Human health in relation to exposure to solar ultraviolet radiation under changing stratospheric ozone and climate. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 18, p. 641–680, 2019.

LUCCA, L. G. et al. Nanoemulsification Potentiates In Vivo Antiedematogenic Effect of Copaiba Oil. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, p. 583–590, 2017.

LUCCA, L. G. et al. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, p. 522–530, 2018.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 2019.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 298–308, 2004.

MCDERMOTT, L. A. et al. Defining the Functional Role of Na V 1.7 in Human Nociception. **Neuron**, v. 101, n. 5, p. 905–919.e8, 2019.

MCINTYRE, M. K. et al. Progress of clinical practice on the management of burn-associated pain: Lessons from animal models. **Burns**, v. 42, n. 6, p. 1161–1172, 2016.

MILLER, A. C. et al. Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 5, p. e159–e165, 2012.

MORGUETTE, A. E. B. et al. Hydrogel Containing Oleoresin From *Copaifera officinalis* Presents Antibacterial Activity Against *Streptococcus agalactiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–16, 2019.

NAGAKURA, Y. Challenges in drug discovery for overcoming dysfunctional pain: An emerging category of chronic pain. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 10, p. 1043–1045, 2015.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1304–1312, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NUNES ALVES, A. P. N. et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203–210, 2015.

ORAZIO, J. D. et al. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222–12248, 2013.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

OSSIPOV, M. V.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2014.

PADILHA, D. et al. Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq . L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 829–844, 2019.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the Wound Healing Activity of Oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 737–739, 2002a.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 2002b.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 156–166, 2017.

PECK, M.; PRESSMAN, M. A. The correlation between burn mortality rates from fire and flame and economic status of countries. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1054–1059, 2013.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PRESCOTT, S. A.; RATTÉ, S. **Somatosensation and Pain**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

QUEIROZ, L. F. T. et al. Epidemiology and outcome analysis of burn patients admitted to an Intensive Care Unit in a University Hospital. **Burns**, v. 42, n. 3, p. 655–662, 2016.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1267–1276, 2010.

RICHARDSON, P.; MUSTARD, L. The management of pain in the burns unit. **Burns**, v. 35, p. 921–936, 2009.

ROMANHOLE, R. C. et al. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 4, p. 366–370, 2015.

SAAVEDRA, P. A. et al. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. **International journal of burns and trauma**, v. 9, n. 5, p. 88–98, 2019.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

SCHALKA, S. et al. Brazilian consensus on photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 6, p. 1–74, 2014.

SCHOLZ, J. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 53–59, 2019.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

SCHUCH, A. P. et al. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1259–1272, 2013.

SCHUCH, A. P. et al. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, n. September 2016, p. 110–124, 2017.

SISIGNANO, M. et al. Synthesis of lipid mediators during UVB-induced inflammatory hyperalgesia in rats and mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2013.

SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.

SUMMER, G. J. et al. Burn Injury Pain: The Continuing Challenge. **Journal of Pain**, v. 8, n. 7, p. 533–548, 2007.

TALBOT, S.; FOSTER, S. L.; WOOLF, C. J. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. **Annual Review of Immunology**, v. 34, p. 421–447, 2016.

TAN, M.; LAW, L. S. C.; GAN, T. J. Optimiser le contrôle de la douleur pour faciliter la Récupération rapide après la chirurgie. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 62, n. 2, p. 203–218, 2015.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2010.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377–391, 2007.

TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.

TREEDE, R.-D. et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **PAIN**, v. 160, n. 1, p. 19–27, jan. 2019.

TRINDADE, R. DA; SILVA, J. K. DA; SETZER, W. N. Copaifera of the neotropics: A review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

UVA, L. et al. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, n. iv, 2012.

VANDEWAUW, I. et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 662–666, 2018.

VEIGA JR., V. F. . et al. Phytochemical and Antioedematogenic Studies of Commercial Copaiba Oils Available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 476–480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero Copaifera L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VRIENS, J.; NILIUS, B.; VOETS, T. Peripheral thermosensation in mammals. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 573–589, 2014.

WAGNER, V. P. et al. Effects of Copaiba Oil Topical Administration on Oral Wound Healing. **Phytotherapy Research**, n. February, p. 6–11, 2017.

WANG, Y. et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 3–17, 2017.

**WHO. World Health Organization. Burns.**

WILLIAMS, A. C. DE C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420–2423, 2016.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WOOLF, C. J. Capturing Novel Non-opioid Pain Targets. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 1, p. 74–81, 2019.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353–364, ago. 2007.

ZUANAZZI, JOSÉ ANGELO S. MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômica. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421–1428, 2010.

## ANEXOS

Abaixo consta o certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA) para o artigo científico desenvolvido e também a dispensa de autorização da revista *Journal of Ethnopharmacology* para uso do artigo científico na dissertação.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da  
Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA DE UMA FORMULAÇÃO CREME CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA", protocolada sob o CEUA nº 4575250917 (ID 001699), sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Gabriela Becker; Indira Brusco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 09/11/2017.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC ACTIVITY OF A CREAM FORMULA CONTAINING COPAIBA OIL", utilizing 30 Heterogenics mice (30 males), protocol number CEUA 4575250917 (ID 001699), under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Gabriela Becker; Indira Brusco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 11/09/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2017](#) a [08/2018](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 4 semanas](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia do Prédio 18.

Santa Maria, 17 de novembro de 2020

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria



### Copaiba oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice

**Author:**

Gabriela Becker, Indira Brusco, Rosana Casoti, Marila Crivellaro Lay Marchiori, Letícia Cruz, Gabriela Trevisan, Sara Marchesan Oliveira

**Publication:** Journal of Ethnopharmacology

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 25 March 2020

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)