



## ANÁLISE HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA

*Ana Carolina Guidi<sup>1</sup>; Gislaine Cardoso de Souza<sup>2</sup>; Valéria do Amaral<sup>3</sup>*

**RESUMO: Introdução:** O homem sempre buscou na natureza plantas medicinais para satisfazer suas necessidades primárias à saúde. Entre os extratos vegetais, destaca-se o óleo de copaíba, amplamente utilizado no Brasil como anti-inflamatório e cicatrizante. **Objetivo:** Avaliar a ação cicatrizante e anti-inflamatória do óleo de copaíba. **Método:** Para o estudo da cicatrização, serão utilizados 63 ratos Wistar, distribuídos em três grupos de 18 animais de acordo com o período de tratamento de 7, 14 e 21 dias. Cada grupo será subdividido em: grupo controle salina (n=6); grupo tratado com óleo de copaíba puro (n=6); grupo tratado com creme a 10% de óleo de copaíba (n=6) e grupo controle base-creme (n=3). Ao término do tratamento serão coletadas amostras para realização da análise histopatológica. Para avaliar a ação anti-inflamatória, serão utilizados 72 camundongos Swiss. A indução da inflamação será por aplicação de óleo de cróton no tecido auricular. Os animais serão distribuídos em dois grupos: fase aguda e crônica, formados por 36 animais cada e subdivididos em cinco grupos, de acordo com o tratamento recebido, sendo eles: grupo tratado com óleo de copaíba (n=8); grupo controle negativo acetona (n=8); grupo controle positivo Acetato de Dexametasona creme 1 mg (n=8); grupo tratado com creme de óleo de copaíba 10% (n=6) e o grupo controle negativo base do creme (n=6). No final de cada fase, serão coletadas amostras para pesagem e testes estatísticos. **Resultados esperados:** Espera-se, verificar a atividade cicatrizante e anti-inflamatória do óleo de copaíba.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anti-inflamatório; Cicatrização; Fitoterápicos; Óleo de copaíba.

### 1 INTRODUÇÃO

A população sempre buscou as plantas para satisfazerem suas necessidades de cuidados primários à saúde. Um dos agentes utilizados é o óleo de copaíba, que apresenta diversas propriedades farmacológicas em estudo, incluindo a ação anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, analgésica e antiparasitária (SACHETTI, 2010; PIERI et al, 2009). Segundo Cavalcanti Neto (2005), os sesquiterpenos, diterpenos e ácido polilático, encontrados na estrutura química do óleo são os responsáveis pela maioria desses quando administrados por via oral ou tópica.

A inflamação é uma reação normal dos tecidos à agressão. É um mecanismo de defesa para eliminar a causa inicial da lesão celular e suas consequências. Caracteriza-se por quatro sinais: rubor, calor, tumor e dor. Dependendo da sua duração, a inflamação

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). carol\_guidi@hotmail.com.br

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. gislainefiaes@hotmail.com

<sup>3</sup> Orientadora, Professora Mestre do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. profvadoamaral@gmail.com

pode ser em aguda, permanecendo por minutos ou dias e crônica, persistindo por semanas ou meses. (MONTENEGRO; FRANCO, 2006; ROBBINS et al, 2005).

A cicatrização é uma sequência de respostas celulares para restabelecer a integridade dos tecidos (MONTES et al, 2009). O processo de cicatrização é dividido em três fases: fase inflamatória, fibroblástica e de remodelamento. Na fase inflamatória, os eventos estão voltados para o tamponamento dos vasos, formando um trombo rico em plaquetas (BALBINO et al, 2005). Na fase fibroblástica, há produção de colágeno no local e a matriz extracelular é substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (MONTES et al, 2009). Na fase de remodelamento, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras de colágeno e adquire características da cicatriz (BALBINO et al, 2005).

Os efeitos cicatrizantes já foram demonstrados em modelos animais, reduzindo o tempo de reparação tecidual. Em outros trabalhos, observou-se um aumento do diâmetro da crosta das lesões, perda de pêlos e presença de escaras em torno de feridas cutâneas em ratos (ESTEVÃO, 2008; CAVALCANTI NETO et al, 2005).

Com base nestas informações pretende-se investigar a ação cicatrizante e anti-inflamatória do óleo de copaíba através da aplicação tópica no dorso de ratos e na orelha de camundongos, respectivamente.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa experimental será realizada no laboratório de farmacologia do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR) e o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais do Cesumar (CEUA – Cesumar).

O óleo de copaíba utilizado será adquirido em Ji-Paraná – Rondônia proveniente de uma feira livre, extraído e armazenado de maneira artesanal. Uma amostra do óleo será enviada a laboratório terceirizado para testes de controle de qualidade. Antes do do tratamento, os animais ficarão em sala de ambientação durante sete dias em gaiolas de plástico de contenção em número máximo de seis animais, em condição de temperatura de 22° a 23°C, com ciclo de luz/escuro de 12/12 horas. Os animais serão alimentados com ração industrial e água *ad libitum*. Será observado diariamente o comportamento dos animais para evitar possíveis lesões entre os mesmos.

### 2.1 CICATRIZAÇÃO

Serão utilizados no experimento 63 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 300–350g, procedente do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais serão distribuídos de forma aleatória em três grupos de 18 animais de acordo com o período de observação (7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias) de pós-operatório. Cada grupo será subdividido em 4 subgrupos, sendo: grupo controle salina (n=6), grupo tratado com óleo de copaíba puro (n=6), grupo tratado com creme à 10% de óleo de copaíba (n=6) e grupo controle base-creme (n=3).

Para indução das feridas, os animais serão colocados em cuba de vidro fechada com algodão hidrófilo embebido com éter etílico até atingir nível de anestesia. Todos os animais serão submetidos ao mesmo procedimento que consiste inicialmente na epilação manual do dorso numa extensão de 6 cm no comprimento e 4 cm na largura. Cada animal será imobilizado por tensores elásticos em prancha cirúrgica, com manutenção anestésica. No centro da área epilada será feita um demarcação com um *punch* metálico cortante realizando uma incisão circular de 6 mm através da retirada de fragmento cutâneo. Após este procedimento o tratamento será iniciado imediatamente.

O grupo controle não receberá tratamento, enquanto que nos grupos tratados com óleo de copaíba, creme de óleo de copaíba a 10 % e base-creme será administrado um volume que contemple toda a área da incisão a ser tratada. O volume determinado será padronizado para todos os grupos tratados e aplicados de forma tópica. O óleo de copaíba puro será administrado com auxílio de conta-gotas, enquanto a base-creme e o creme incorporado com óleo serão aplicados com o auxílio de espátulas esterilizadas.

Ao final de cada período de observação, os ratos serão submetidos à eutanásia com dose letal de pentobarbital (100mg/Kg). Serão fixados à prancha cirúrgica para coleta das amostras morfológicas. As feridas serão analisadas para verificação de crosta, secreções, cicatrização e tamanho.

Com o auxílio de um paquímetro será medido o diâmetro da incisão cirúrgica e posteriormente a ferida será excisada numa margem de 1 cm de diâmetro em torno da lesão, cada peça será identificada individualmente e conservada em solução de formalina tamponada 10% durante uma semana. Após este período, serão transferidas para álcool etílico 70% e serão encaminhadas ao laboratório de análises patológicas para confecção das lâminas de avaliação histopatológica.

## 2.2 INFLAMAÇÃO

Para testar a atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba, serão utilizados 72 camundongos Swiss, pesando entre 30 e 45g, procedente do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A indução da inflamação será através da aplicação tópica de óleo de cróton (200 µg/orelha) nas orelhas dos camundongos.

Os animais serão distribuídos de forma aleatória em dois grupos: fase aguda e crônica, formados por 36 animais cada e subdivididos em cinco grupos, de acordo com o tratamento recebido. Serão eles: o grupo tratado com óleo de copaíba (n=8); grupo controle negativo acetona (n=8); grupo controle positivo Acetato de Dexametasona creme 1 mg (n=8); grupo tratado com creme de óleo de copaíba 10% (n=6) e o grupo controle negativo base do creme (n=6).

A resposta anti-inflamatória será observada em fase aguda e crônica. Ao final dos tratamentos, os camundongos serão eutanasiados com dose letal de pentobarbital (100mg/Kg), para a coleta de amostras de 6 mm de diâmetro do tecido auricular, as quais serão pesadas e comparadas, obtendo-se a diferença de peso entre a orelha controle (direita) e a tratada (esquerda). Os resultados obtidos com a pesagem serão submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido por Tukey's Multiple Comparison Test.

O protocolo experimental de indução do processo inflamatório procederá igualmente nas fases aguda e crônica. A diferença entre as mesmas será o período de observação e a duração do tratamento.

Os animais serão mantidos em jejum e com livre acesso de água por um período de 12 horas antes do início dos procedimentos. Após a indução da inflamação os tratamentos serão iniciados imediatamente.

**Fase aguda:** No grupo tratado com óleo de copaíba, será realizada aplicação tópica de 20µL do óleo, com auxílio de micropipeta, contemplando toda área auricular. Da mesma forma, o grupo controle acetona, receberá 20 µL do diluente aplicado topicamente na orelha com micropipeta. Nos grupos tratados com Acetato de Dexametasona creme 1 mg, creme de óleo de copaíba 10 % e base do creme, a aplicação será realizada com auxílio de swab, em um volume que complete a área a ser tratada. Os animais submetidos ao tratamento serão monitorados por um período de 6 horas e logo após este período, serão

eutanasiados com dose letal de pentobarbital (100mg/Kg) para coleta das amostras do tecido auricular.

**Fase crônica:** Os animais receberão tratamento em dias alternados com óleo de cróton (1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dia) e a partir do 5<sup>o</sup> dia, os animais serão tratados diariamente de acordo com os grupos, até o final dos experimentos. No grupo tratado com óleo de copaíba, será realizada aplicação tópica de 20 µL do óleo, com auxílio de micropipeta, completando toda área auricular. Da mesma forma, o grupo controle acetona, receberá 20µL do diluente, aplicado topicamente na orelha com micropipeta. Nos grupos tratados com acetato de Dexametasona creme 1 mg, creme de óleo de copaíba 10 % e base do creme, a aplicação será realizada com auxílio de swab, em um volume que complete a área a ser tratada. Os animais serão tratados e monitorados por um período de 9 dias. Logo após este período serão eutanasiados com dose letal de pentobarbital (100mg/Kg) para coleta das amostras do tecido auricular.

### 3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se ao final desse trabalho, verificar a atividade cicatrizante e anti-inflamatória do óleo de copaíba usado popularmente. Espera-se também, correlacionar o uso ou não do óleo nos processos inflamatórios e lesões teciduais, identificando resultados favoráveis para os mesmos.

### REFERÊNCIAS

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n.1, jan./mar., 2005.

CAVALCANTI NETO, A. T.; ARRUDA, T. E. P.; ARRUDA, T. T.P.; PEREIRA, S. L. S.; TURATTI, E. Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudos histológicos em dorsos de ratos. **Revista de Odontologia: UNESP**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 107-112, 2005.

ESTEVÃO, L. R. M.; **Aspectos morfológicos e morfométricos de retalhos cutâneos e ratos (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*)**. 54 folhas. Dissertação (Mestrando em Ciência Veterinária) – Universidade Rural de Pernambuco, 2008.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 2006.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI L.; ANDREATTA F. S.; SANT'ANNA, M. E. S.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. **Evidências para o uso do óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática**. Natureza online, v. 7, n.2, p. 61- 67, 2009. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>> Acesso em: 20/07/2013.

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**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465- 472, 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia**: bases patológicas das doenças. 7. Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

SACHETTI, C. G. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaíba em ratos: Estudos de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade**. 91 folhas. Dissertação (Mestrando em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, 2010.