



17º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: CICATRIZAÇÃO CORNEAL DE ÚLCERAS QUIMICAMENTE INDUZIDAS E TRATADAS COM COLÍRIO À BASE DE ÓLEO DE COPAIFERA MULTIJUGA HAYNE 0,5%: ASPECTOS HISTOLÓGICOS

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: MEDICINA VETERINÁRIA

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE DE FRANCA

AUTOR(ES): GABRIELA BALDINI GANAQUI

ORIENTADOR(ES): ADRIANA TORRECILHAS JORGE, CRISTIANE DOS SANTOS HONSHO, DENISE CRISPIM TAVARES, FERNANDA GOSUEN GONÇALVES DIAS, FERNANDO CHAHUD, JAIRO KENUPP BASTOS, LUCAS DE FREITAS PEREIRA

Realização:



Apoio:



RESUMO

Encontram-se na literatura, estudos com o óleo de copaíba avaliando seus efeitos anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante, sobre diversos órgãos ou tecidos, porém, nada é descrito quanto à utilização e sua eficácia em oftalmologia. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar histologicamente a córnea com úlcera quimicamente induzida e tratada com óleo de *Copaifera multijuga* Hayne. Foram empregados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albino), machos pesando entre 250 e 300 gramas. Após os animais serem anestesiados, foi induzida a úlcera de córnea utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N. Os animais foram divididos em quatro grupos (GC, GL, GE e GT), respectivamente tratados com o óleo de copaíba a 0,5%, lubrificante ocular, pomada oftálmica comercial e Tween 80 a 0,5%, a intervalos de seis horas, durante os períodos de avaliação 48h (n=12) e 72h (n=12). Concluídos os tempos de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia com pentobarbital sódico e seus bulbos oculares coletados pela técnica de enucleação subconjuntival. Após a preparação rotineira das lâminas para microscopia de luz e coloração em HE, estas foram avaliadas para presença de epitélio corneal, bem como as características celulares das camadas corneais, presença de células inflamatórias e de neovascularização estromal. Às 48 horas, observou-se presença de epitélio corneal em 100% de GE, em 50% de GC e GT, e apenas 16,7% de GL; às 72 horas, verificou-se 83,3% de GE, 66,7% de GL, 50% de GC e 33,3% de GT. Infiltrados inflamatórios em estroma estiveram presentes em todos os animais às 48 e em 72 horas verificou-se em 100% de GC, GT e GL e 80% de GE. Em câmara anterior, fibrina esteve em 50% de GC às 48h e 33,3% em 72h; em GT verificou-se 16,7% em 48h e 33,3% em 72h; em GE observou-se 16,7% às 48 e 72h e em GL 66,7% às 48h e 16,7% às 72h. Hifema foi visto em 33,3% de GC às 48h e em 16,7% às 72h; em GT somente em 16,7% às 72h; em GE e GL houve 16,7% em 48h, em GL 16,7% às 72 horas. Concluiu-se que o óleo de copaíba foi capaz de promover a reepitelização corneal, podendo ser utilizado como coadjuvante no tratamento de úlcera químicas.

1 INTRODUÇÃO

O óleo de copaíba é extraído do tronco da copaibeira através de perfurações e sua constituição é cerca de 45% de óleos essenciais e 55% de resina (MONTES et

al., 2009). As características do óleo variam de acordo com a procedência da copaíba e do tipo de solo em que a árvore se encontra (MENDONÇA; ONOFRE, 2009). As espécies comumente observadas no Brasil são a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera cariaceae* e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Trata-se de uma solução de ácidos diterpênicos, sendo o óleo essencial constituído por sesquiterpenos (MONTES et al., 2009), o quais se dividem em oxigenados e hidrocarbonetos (GOMES et al., 2008). O ácido copálico e os sesquiterpenos trans- β -cariofileno (GOMES et al., 2010) e o α -copaeno são os principais componentes do óleo (MENDONÇA; ONOFRE, 2009).

Além das inúmeras aplicações do óleo em cosméticos e outras indústrias, existem descritas algumas dezenas de propriedades medicinais diferentes como. efeito anti-inflamatório, antisséptico, antiasmático, expectorante. Ainda é empregado como analgésico, antidiarreico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, anti-herpético, bactericida, anticancerígeno, antitumoral, no tratamento de leishmaniose, reumatismo, hemorragias, paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra (MENDONÇA; ONOFRE, 2009; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Dentre as espécies de copaíba, o óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne apresenta destaque quanto a sua ação anti-inflamatória, analgésica (GOMES et al., 2007) e antitumoral (GOMES et al., 2010). Em 2009, Mendonça e Onofre verificaram a eficácia do óleo-resina para inibir o crescimento da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As ceratites ulcerativas são, entre as oftalmopatias, as mais comumente relatadas (GELATT, 2014) e aquelas provocadas pela ação de agentes alcalinos representam grande desafio para manutenção da visão, em decorrência do intenso processo inflamatório suscitado (NISHIWAKI-DANTAS; DANTAS; REGGI, 2001; PERCHES et al., 2012a).

2 OBJETIVOS

Diante dos benefícios do uso de óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne e da ausência de informações que validem sua utilização em oftalmologia, o objetivo deste estudo foi avaliar à histologia, o efeito do colírio à base do óleo de copaíba a 0,5% (*Copaifera multijuga* Hayne), em úlceras corneais provocadas quimicamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS, DESENVOLVIMENTO

A pesquisa foi realizada atendendo as normais internacionais da Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (NIH, 1985), bem como pela comissão de ética da Universidade de Franca (UNIFRAN), protocolo número 051/13.

Empregaram-se 32 ratos machos, Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albino), clinicamente hípidos, de 250 a 350 gramas. O óleo-resina de *C. multijuga* e as informações sobre as suas composições químicas, foram fornecidos pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade de Franca, Franca, São Paulo.

O colírio à base de óleo de copaíba 0,5% foi homogeneizado juntamente com solução de Tween 80 a 0,5%, água destilada foi acrescentada e novamente homogeneizada com a solução e o pH da solução verificado, devendo-se este ser neutro. O óleo permaneceu em temperatura ambiente, protegido da luz, durante 24 horas.

Os animais foram anestesiados com solução de 50mg/kg de cloridrato de cetamina (Vetaset®- Zoetis Ind. Prod. Veterinários Ltda, São Paulo/SP, Brasil) e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompum®- Bayer Saúde Animal, São Paulo/SP, Brasil), aplicada por via intraperitoneal. Realizou-se a antisepsia do olho esquerdo e a aplicação de colírio de proximetacaína (Anestalcon® -Alcon do Brasil, São Paulo/SP, Brasil), imediatamente antes da aplicação do álcali.

Discos de papel filtro Whatman 41 de três mm de diâmetro foram embebidos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e colocados no centro da córnea, durante 80 segundos. A córnea foi lavada copiosamente com solução fisiológica e o teste de fluoresceína realizado para comprovação da úlcera córnea.

Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais cada. O G1 recebeu óleo de copaíba a 0,5%; GT solução Tween 80 a 0,5%; GE, pomada oftálmica comercial à base de acetato de retinol, aminoácidos, metionina e cloranfenicol (Regence® - Latnofarma Indústrias Farmacêuticas Ltda, Cotia/SP, Brasil); e o GL lubrificante ocular à base de dextrano e hipromelose (Lacribell® - Latnofarma Indústrias Farmacêuticas Ltda, Cotia/SP, Brasil), a intervalos de 6 horas, durante 72 horas consecutivas. Após o procedimento, os animais receberam cloridrato de tramadol (5mg/Kg) (Tramadon®Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo/SP, Brasil), por via subcutânea, a cada 12 horas, durante 3 dias.

No período de 48 e 72 horas, os animais foram submetidos à eutanásia com pentobarbital sódico (120mg/kg) por via intraperitoneal e os bulbos oculares colhidos e mantidos em formol tamponado a 10% até o processamento das lâminas e sua coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico, quanto a presença de espongiose e depósito anômalo, infiltrado inflamatório, neoformação vascular, edema, fibrina, hemorragia, cicatrização corneal e reação na câmara anterior.

4 RESULTADOS

Referente à 48 horas, observou-se a presença do epitélio da córnea em 100% de GE, em 50% de GC e GT, e apenas 16,7% de GL; às 72 horas verificou-se 83,3% de GE, 66,7% de GL, 50% de GC e 33,3% de GT. Infiltrados inflamatórios no estroma estavam presentes em todos os animais em 48 horas e em 72 horas, foi encontrado em 100% de GC, GT, GL e 80% de GE. Na câmara anterior, a fibrina estava em 50% de GC em 48h e 33,3% em 72h; no GT verificou-se 16,7% em 48h e 33,3% em 72h; no GE, observou-se 16,7% em 48 e 72h e GL 66,7% em 48h e 16,7% em 72h. Hifema foi observado 33,3% de GC em 48h e 16,7% em 72h; em GT apenas 16,7% em 72h; em GE e GL, houve 16,7% em 48h, em GL 16,7% em 72h.

Os resultados referentes a essas observações, nos períodos 72 e 48 horas após a lesão, encontram-se dispostos, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2 e as imagens, referentes aos diferentes tratamentos encontram-se nas Figuras 1 e 2.

Tabela 1. Descrição histológica dos bulbos oculares de ratos submetidos à ulcera corneal química, apresentando alterações no epitélio, estroma e câmara anterior. Os grupos aludem-se ao tratamento com lubrificante ocular (GL); pomada oftálmica comercial (GE); solução Tween 80% (GT); e óleo de copaíba 0,5% (GC). Resultado referente a 72 horas de avaliação. Ausente (0), Presente (1), Moderado (2), Acentuado (3). Neovascularização: Discreto (1) refere-se a 5 vasos, Moderado (2) refere-se a 5 a 10 vasos, Acentuado (3) refere-se a mais de 10 vasos.

Grupo	Animal	EPITÉLIO			ESTROMA			CÂMARA ANTERIOR		
		Epitélio	Vacuolização	Espongiose	Neovascularização	Células Inflamatórias	Edema	Hifema	Fibrina	Células Inflamatórias
GL	1	0	0	1	3	3	1	0	1	3
	2	0	1	1	2	3	3	0	1	0
	3	1	1	0	1	3	3	0	2	2
	4	1	1	1	0	1	1	2	0	1
	5	1	0	1	3	3	1	0	0	0
	6	1	0	1	0	2	3	0	0	0
	7	1	1	1	2	1	0	0	0	0
GE	8	1	1	0	1	2	3	2	2	2
	9	0	1	1	0	1	1	1	0	1
	10	1	1	1	0	3	3	0	0	0
	11	1	1	1	0	2	3	0	0	0
	12	1	0	0	1	2	2	0	0	0
	13	1	1	3	1	3	1	1	1	0
	14	1	1	1	0	1	1	1	3	2
GC	15	1	1	1	1	3	3	0	0	0
	16	1	0	0	1	2	0	0	0	0
	17	1	1	1	0	1	1	2	0	0
	18	1	0	1	1	3	2	1	2	2
	19	1	1	1	0	2	2	1	1	1
GT	20	1	0	1	1	3	3	0	0	0
	21	1	1	1	1	3	2	0	0	0
	22	1	0	1	0	3	2	0	0	0
	23	1	0	0	3	3	0	0	0	0

Tabela 2. Descrição histológica dos bulbos oculares de ratos submetidos à ulcera corneal química, apresentando alterações no epitélio, estroma e câmara anterior. Os grupos aludem-se ao tratamento com lubrificante ocular (GL); pomada oftálmica comercial (GE); solução Tween 80% (GT); e óleo de copaíba 0,5% (GC). Resultado referente a 48 horas de avaliação. Ausente (0); Presente (1); Moderado (2); Acentuado (3). Neovascularização: Discreto (1) refere-se a 5 vasos; Moderado (2) refere-se a 5 a 10 vasos; Acentuado (3) refere-se a mais de 10 vasos.

Grupo	Animal	EPITÉLIO			ESTROMA			CÂMARA ANTERIOR		
		Epitélio	Vacuolização	Espongiose	Neovascularização	Células Inflamatórias	Edema	Hifema	Fibrina	Células Inflamatórias
GL	1	0	1	1	3	3	3	2	1	1
	2	1	1	1	1	2	3	1	1	0
	3	1	0	0	1	3	1	0	0	0
	4	0	1	1	3	3	1	1	0	1
	5	1	1	1	0	2	2	1	0	0
	6	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	7	1	0	0	3	3	1	0	1	1
	8	1	1	1	2	3	3	0	0	0
GE	9	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	10	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	11	0	0	3	0	3	2	0	0	2
	12	0	1	1	1	3	3	0	0	2
	13	1	0	1	1	2	0	1	1	1
	14	1	0	1	3	2	2	0	0	1
GT	15	0	1	1	3	3	3	1	1	1
	16	1	1	1	0	1	2	0	0	1
	17	0	1	1	0	3	3	3	0	2
	18	1	1	1	3	3	1	3	2	3
	19	1	0	0	1	2	1	0	0	0
	20	1	0	1	1	3	1	0	0	0
GC	21	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	22	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	23	1	1	1	1	3	3	0	0	0

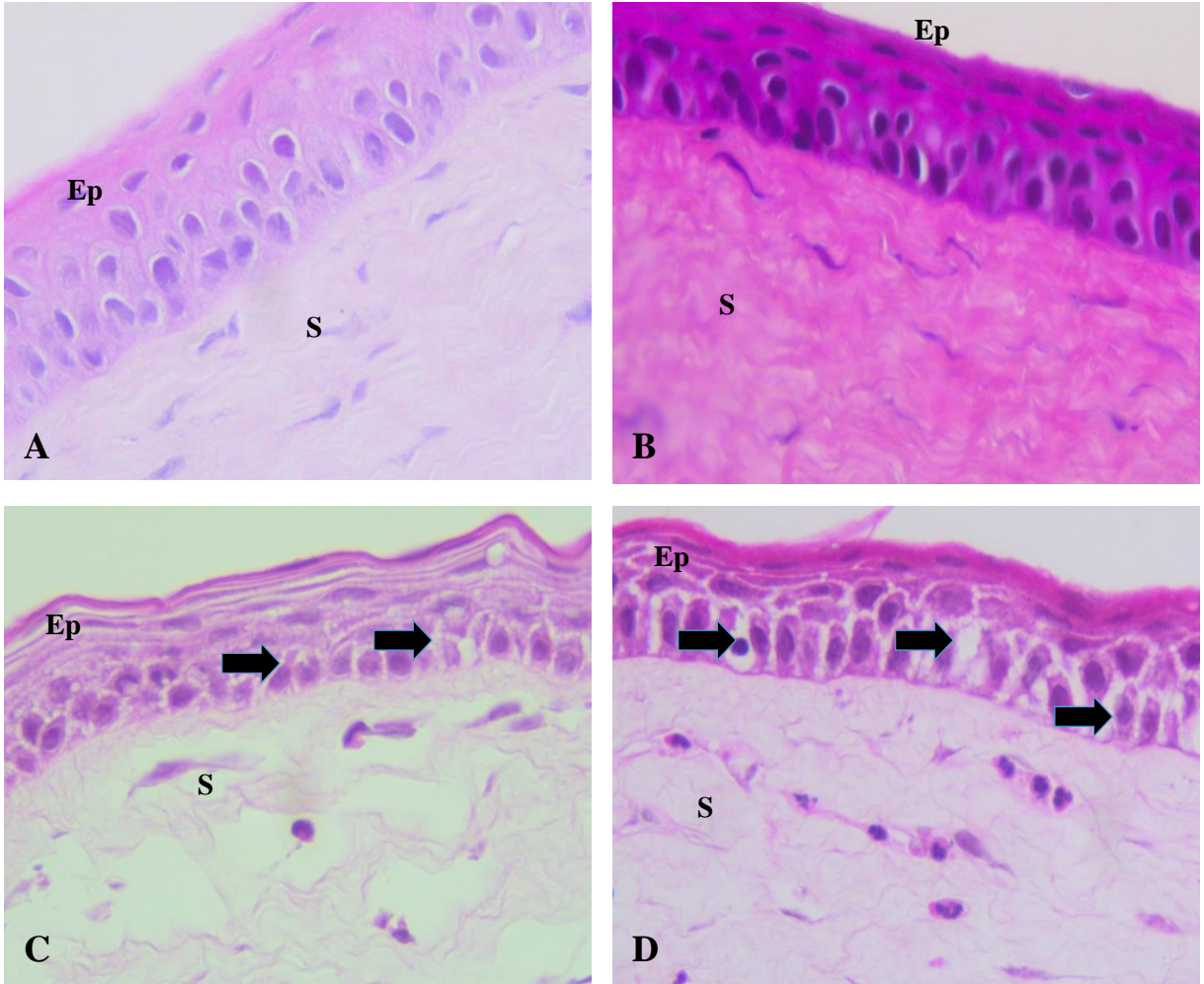


Figura 1. Fotomicrografia da córnea esquerda de ratos. Nota-se em A, B, C e D o epitélio normal referente às 48 e 72 horas de instilação em gotas do óleo de Copaíba a 0,5% (GC). Observe o epitélio (Ep), o estroma (S) e a espongiose (setas), (HE 400X).

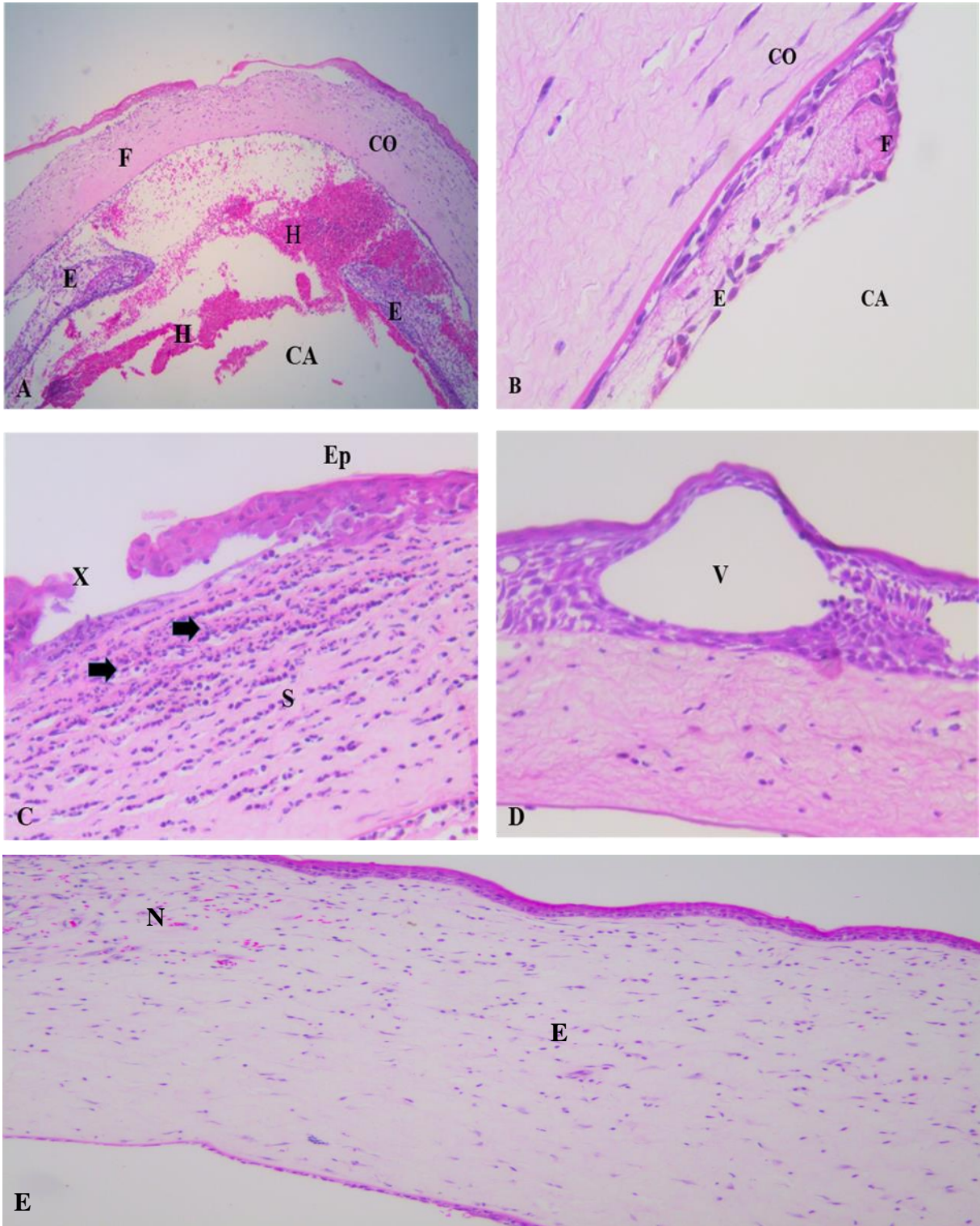


Figura 2. Fotomicrografia de córnea (CO) e câmara anterior (CA) esquerda ratos. Observe em A (GL, 48h) Fibrina (F), Hifema (H) e Células inflamatórias (E) (HE, 100X). Em B (GE, 48h) Fibrina (F) e Células inflamatórias (E) próxima ao Endotélio Corneal (HE, 400X). Em C, observe epitélio corneal (Ep), estroma (S), células inflamatórias (setas), ausência de epitélio (X), (HE. 200X). Em D, vesícula intra-epitelial (V) (GL, 48hs; HE. 200X). Em E Células inflamatórias (E) e Neovascularização (N) (72h, HE, 100X).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A opção por utilizar o óleo de Copaíba como uma substância adjuvante para a cicatrização corneal se deu, principalmente pelas várias citações de sua atividade anti-inflamatória, antibiótica, analgésica (GOMES et al., 2007) e antitumoral (GOMES et al., 2010), porém sem relatos sobre sua atuação na superfície ocular.

Outras substâncias naturais já foram empregadas em úlceras corneais quimicamente induzidas, como própolis (MARTIN et al., 2013), *Citrus lemon* (PERCHES et al., 2012b) e *Aloe vera* (ATIBA et al., 2015). Martin e colaboradores (2013), utilizaram própolis brasileiro no tratamento de úlceras corneais quimicamente induzidas e observaram a cicatrização e neutrófilos infiltrados na córnea, nos períodos de 12, 24, 48 e 120 horas, havendo a completa reepitelização entre 48h e 120h, a aplicação tópica acelerou a cicatrização e reduziu a resposta inflamatória após a queimadura corneal em ratos. Atiba et al. (2015) examinaram histologicamente o grau da inflamação e a cicatrização do *Aloe vera*. O experimento foi realizado em ratos saudáveis e diabéticos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Observaram-se múltiplas células escamosas com o epitélio da córnea e alguns fibroblastos dentro do estroma e o mínimo de células infiltradas. Verificaram completa reepitelização e efeitos imunomoduladores e cicatrizantes. Perches et al. (2012b) utilizaram o *Citrus lemon* nas concentrações a 1,5%, 3% e 5%, nos dias 0, 1 e 5. A concentração de 3% apresentou estimulação na proliferação celular, aumentou a celularidade e vascularização, favorecendo a reepitelização.

Neste estudo, segundo a avaliação histológica, verificou-se formação de epitélio e manutenção do mesmo durante os períodos estudados. Com relação à inflamação, presença de fibrina e hifema, foi possível observar diminuição destes durante os períodos avaliados, podendo-se sugerir que o óleo de copaíba foi capaz de beneficiar o processo cicatricial em úlceras quimicamente induzidas. Porém, enfatiza-se que a avaliação das lesões por um período maior e a análise da expressão de metaloproteinasas (MMPs), que são enzimas proteolíticas que tem a função de remodelar, secretar citocinas, fatores de crescimento e inibidores, que resultam na sua reparação corneal (OLLIVIER et al., 2007), trariam informações mais fidedignas sobre o efeito do óleo na restituição de úlceras quimicamente induzidas.

Pode-se verificar que a concentração de 0,5%, todos os grupos, no período de 48 horas, apresentaram alterações que caracterizam a severidade da lesão

aguda, com presença elevada de células inflamatórias após o defeito epitelial. Observou-se intensa presença de neovascularização e fibrina no primeiro período (48hrs), principalmente os grupos GL e GC. O epitélio total observa-se no grupo GE e metade no grupo GC e GT. No período de 72hrs houve diminuição de hifema, fibrina e neovascularização; quanto ao epitélio total observa-se nos grupos GE e GC, podendo-se concluir que óleo de copaíba foi capaz de promover a reepitelização da córnea e pode ser usado como coadjuvante no tratamento de úlceras químicas, porém novos estudos são necessários visando a compreensão e observação do processo cicatricial em período tardio.

REFERÊNCIAS

- ATIBA, A. et al. *Aloe vera* gel facilitates re-epithelialization of corneal alkali burn in normal and diabetic rats. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p. 2019-2026, 2015.
- GELATT, K. N. **Essentials of veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2014.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486-492, 2007.
- GOMES, N. 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. 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.
- MARTIN, L. F. T. et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 13, n. 337, p. 1-7, 2013.
- MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 577-581, 2009.
- MONTES, L. V. et al. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza Online**, v. 7, n. 2, p. 61-67, 2009.
- NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; DANTAS, P. E.; REGGI, J. R. Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 9, p. 1031-1033, 2001.
- OLLIVIER, F. J. et al. Proteinases of the cornea and precocular tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n. 4, p. 199-206, 2007.
- PERCHES, C. S. et al. Matriz metaloproteinases na reparação corneal - revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 480-489, 2012a.
- PERCHES, C. S. et al. Uso do colírio de *Citrus lemon* em úlceras de córnea induzidas em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1161-1168, 2012b.
- YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.