

18º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: ÓLEO DE COPAÍBA COMO ADJUVANTE NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS CORNEAIS

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: Medicina Veterinária

INSTITUIÇÃO(ÕES): UNIVERSIDADE DE FRANCA - UNIFRAN

AUTOR(ES): ÉDER GALLET SOARES

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

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, pretende-se avaliar o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), em úlceras corneais provocadas quimicamente. Serão empregados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albino), machos pesando entre 250 e 300 gramas. Após anestesia geral, as úlceras serão confeccionadas no olho esquerdo com disco de papel filtro embebido em hidróxido de sódio a 1N, durante 80 segundos. Os animais serão divididos em quatro grupos, com oito animais cada. O G1 receberá óleo de copaíba a 0,1%; GT solução Tween 80 a 5%; GE, pomada oftálmica comercial à base de acetato de retinol, aminoácidos, metionina e cloranfenicol; e o GL lubrificante ocular à base de dextrano e hipromelose, a intervalos de 6 horas, durante 72 horas consecutivas. Após os tratamentos, os animais serão submetidos à eutanásia ativa, com thiopental 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, serão avaliadas para presença de epitélio corneal, bem como as características celulares das camadas corneais, presença de células inflamatórias e de neovascularização estromal.

INTRODUÇÃO

O óleo de copaíba é muito conhecido e utilizado pela população devido a facilidade com que é encontrado em feiras livres e farmácias de produtos naturais. Desta maneira, estudos são realizados no intuito da comprovação científica de sua propriedade, eficácia terapêutica, efeitos adversos e ação citotóxica (MONTES et al., 2009). As espécies comumente observadas no Brasil são a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera cariacea* e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (PIERI et al., 2009; YAMAGUCHI & GARCIA, 2012).

Existem inúmeras indicações para as diversas espécies do óleo de copaíba, dentre as quais destacam-se nas vias urinárias (efeito anti-inflamatório, antisséptico, tratamento de cistite, incontinência urinária e sífilis), para vias respiratórias (antiasmático, expectorante, no tratamento de bronquite, faringite, hemoptise, pneumonia e sinusite), para as infecções da derme e mucosa, (dermatites, eczemas,

psoríases e ferimentos), para úlceras e feridas no útero. É empregado ainda, como analgésico, antidiarreico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, antiherpético, bactericida, anticancerígeno, antitumoral, no tratamento de leishmaniose, reumatismo, hemorragias, paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra (MENDONÇA & ONOFRE, 2009; YAMAGUCHI & GARCIA, 2012). O óleo é também utilizado na indústria cosmética, como fixador para perfumes, cosméticos e sabões (MONTES et al., 2009).

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 & Onofre verificaram a eficácia do óleo-resina para inibir o crescimento da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginos*.

Diante dos benefícios do uso de óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne e a ausência na literatura de informações que validem sua utilização em oftalmologia, o objetivo deste estudo é avaliar à histologia, o efeito do óleo de copaíba 0,1% (*Copaifera multijuga* Hayne), na forma de colírio, em úlceras corneais provocadas quimicamente.

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 0,1% (*Copaifera multijuga* Hayne), em úlceras corneais provocadas quimicamente.

MATERIAL, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

A pesquisa será realizada atendendo as normas internacionais da Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications number 85-23: Revised 1985), bem como pela comissão de ética da Universidade de Franca (Unifran), protocolo número 051/13.

Animais

Empregar-se-ão 24 ratos machos, Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albino), clinicamente hígidos, de 250 a 350 gramas, fornecidos pelo biotério da Universidade de Franca - Unifran.

Após exame clínico para exclusão de alterações orgânicas e oculares, serão mantidos três animais em cada caixa plástica com cama de maravalha, em ambiente ventilado, limpo, seco, protegido, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C), umidade ($50 \pm 10\%$), sendo 12 horas de ciclo claro-escuro, com ração comercial e água potável *ad libitum*.

Obtenção Óleo Copaiba

O óleo-resina de *C. multijuga* a ser utilizado no estudo, bem como as informações sobre as suas composições químicas, serão fornecidos pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade de Franca, Franca, São Paulo.

O óleo de copaiba na concentração de 0,1% será homogenizado juntamente com solução de Tween 80 a 5%. O Tween 80 é um produto tenso ativo hidrofílico, empregado para obter emulsão do óleo para água (PERCHES et al., 2012b). Após, água destilada é acrescentada e novamente homogenizada com a solução. Ato contínuo verificar-se-á o pH da solução, que deverá ser neutro. O óleo será mantido em temperatura ambiente, protegido da luz, durante 24 horas.

Úlceras corneais

Os animais serão 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 (MOHAN et al., 2008). Antissepsia do olho esquerdo será realizada com polivinil-pirrolidona acrescida à solução fisiológica, na proporção de 1:50. Após, o olho receberá colírio de proximetacaína (Anestalcon[®] - Alcon do Brasil, São Paulo/SP, Brasil), imediatamente antes da aplicação do álcali.

Um disco de papel filtro Whatman 41, será confeccionado com auxílio de trépano de três mm de diâmetro. Depois de embebido durante 30 segundos, em solução de hidróxido de sódio (NAOH) 1N, o disco será colocado na posição central da córnea, durante 80 segundos. Ato contínuo empregar-se-á lavagem copiosa com solução fisiológica para retirada do excesso do álcali. Teste de fluoresceína e documentação fotográfica serão realizados para comprovação da úlcera córnea (PISO, 2011).

Grupos Experimentais e Protocolo Terapêutico

Os animais serão divididos em quatro grupos, com oito animais cada. O G1 receberá óleo de copaíba a 0,1%; GT solução Tween 80 a 5%; GE, pomada oftálmica

comercial à base de acetato de retinol, aminoácidos, metionina e cloranfenicol (Regence[®] - Latinofarma Indústrias Farmacêuticas Ltda, Cotia/SP, Brasil); e o GL lubrificante ocular à base de dextrano e hipromelose (Lacribell[®] - Latinofarma Indústrias Farmacêuticas Ltda, Cotia/SP, Brasil), a intervalos de 6 horas, durante 72 horas consecutivas. Após o procedimento, os animais receberão 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 serão submetidos à eutanásia ativa, com pentobarbital sódico 120mg/kg, intraperitoneal. Através de técnica de enucleação subconjuntival, os bulbos oculares serão colhidos e mantidos em formol tamponado a 10% até o processamento das amostras. Cada período contará com quatro córneas.

Posteriormente, os bulbo oculares serão separados em dois hemisférios, colocados em gradientes e mantidos em solução de álcool a 70% até o processamento. Após, será processado, incluído em parafina e cortado em microtomo à espessura de 5µm e coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas serão avaliadas em microscópio óptico, quanto, presença de espongirose e depósito anômalo, infiltrado inflamatório, neoformação vascular, edema, fibrina, hemorragia, cicatrização corneal e reação na câmara anterior. Os resultados serão expressos em valores absolutos e porcentagens.

RESULTADOS

Em 48 horas, a presença de epitélio da córnea foi observada em 100% de GE e GC e 50% de GT, e apenas 16,7% de GL; às 72 horas, foi observado 83,3% GE, 66,7% GL, 100% GC e 33,3% GT. Infiltrados inflamatórios no estroma foram encontrados em todos os animais em 48 horas e em 72 horas foram encontrados 100% em GC, GT e GL e 80% de GE. Na câmara anterior, a fibrina estava presente em 60% do GC às 48h e 16,6% nas 72h, em GT foi observado 16,7% em 48h e 33,3% em 72h; no GE, observou-se 16,7% em 48h e 72 horas e em GL 66,7% em 48h e 16,7% em 72h. Hifema foi observado em 80% dos GC às 48h; em GT, GE e GL apenas 16,7% em 48 e 72 horas.

Os resultados referentes a observação no período de 48 e 72 horas encontram se disposto nas tabelas abaixo respetivamente:

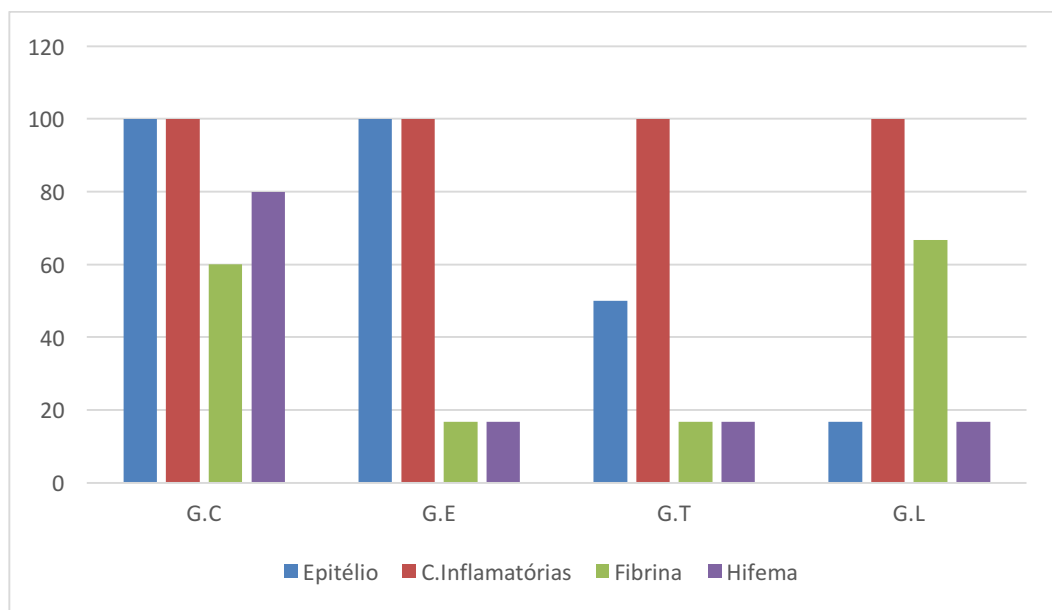


Figura 1: A imagem gráfica demonstra a avaliação da cicatrização da ferida da córnea após o uso do óleo de copaiba a 0,1% e seus respectivos grupos no período de 48 horas.

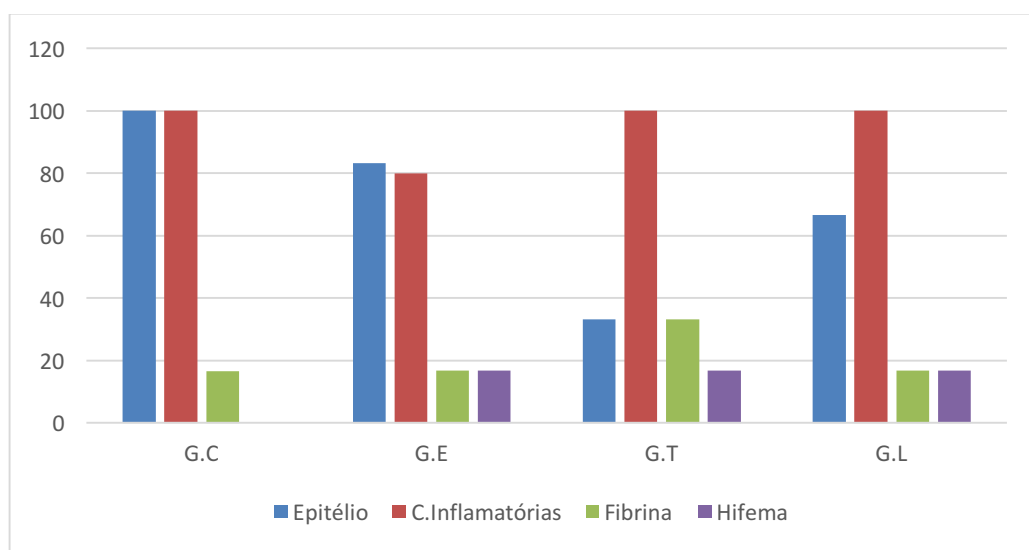


Figura 2: A imagem gráfica demonstra a avaliação da cicatrização da ferida da córnea após o uso do óleo de copaiba a 0,1% e seus respectivos grupos no período de 72 horas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço da medicina, a busca por medicamentos fitoterápicos como alternativa terapêutica de menor custo (CAVALCANTI NETO et al. 2005). O óleo de copaiba merece destaque visto que alguns estudos citam sua atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, antisséptica, sem toxicidade (GOMES et al.,

2007), porém, não há descrição sobre sua utilização na oftalmologia, como adjuvante no tratamento de úlceras de córnea, o que já ocorreu com substâncias naturais como Aloe Vera (ATIBA et al., 2015), Própolis (MARTIN et al., 2013) e *Citrus lemon* (PERCHES et al., 2012b).

Em estudo realizado com *Citrus lemon*, em coelhos, o produto se mostrou eficiente em diversas concentrações, aumentando a celularidade e vascularização e acelerando a cicatrização (ROZZA et al., 2007). Em outro estudo em ratos, o grupo tratado com própolis em ratos apresentou redução na inflamação, e obteve rápida resposta cicatricial (MARTIN et al., 2013). Atiba et al. (2015) em estudo com ratos normais e diabéticos, observaram que os animais que receberam *Aloe vera* obtiveram melhores resultados em todos os parâmetros avaliados.

Neste estudo com óleo de *Copaiba multijuga* Haine, verificou-se a permanência do epitélio no grupo copaíba durante os dois períodos avaliados. Porém, a presença de células inflamatórias em todos os grupos e nos períodos de avaliação, sugerem uma intensa resposta do organismo à lesão provocada. Outro fator avaliado foi a presença de fibrina onde o único grupo que permaneceu foi o GE, os demais grupos tiveram redução. Na avaliação em 72 horas não foi observada a presença de hifema no grupo copaíba, nos demais grupos o mesmo permaneceu, o que nos sugere que o óleo de copaíba pode beneficiar o processo de cicatrização de úlceras provocadas por álcali.

Os resultados deste estudo permitem concluir que o óleo de copaíba foi favorável em relação à manutenção do epitélio, redução de fibrina e hifema, podendo ser utilizado como coadjuvante no tratamento de úlceras de córnea provocados por álcali.

REFERÊNCIAS

- ARVO. Statement for the Use of Animals. In **Ophthalmic and Visual Research**. Disponível em: <http://www.arvo.org/About_ARVO/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/>. Acesso em: 30/04/2013.
- BANKS, W. J. Olho e ouvido. Em: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. p.589-595.
- BRITO, V.H.B.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A.S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de

uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, p. 243-246, 2005.

CAVALCANTE 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. Estudo histológico em dorso de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.34, n.2, p.107-112, 2005.

COLLINS, B. K. Afecções do Globo Ocular: Córnea e Esclerótica. In: BOJRAB, M. J. *Mecanismos das Moléstias na Cirurgia dos Pequenos Animais*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1996. p.152-161.

CONCEIÇÃO, L.F. **Efeitos do cetorolaco de trometamina 0,5%, sem preservativo, sobre a resposta inflamatória, a sensibilidade e re-epitelização corneais em coelhos submetidos a ulceração da córnea**. 2010. 82F. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GELATT, K. N. **Essentials of Veterinary Ophthalmology**, 3rd ed, Wiley-Blackwell: Philadelphia. 2014, 720p.

GOMES, N.M.; REZANDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.177–183, 2010. BOTELHO, N.M.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; CARREA, S. C.; LOBATO, R.C.; BRITO, R.B. Estudo morfológico do efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba em ratos. **Revista Paraense de Medicina** v. 25, n. 1, p. 9-14, 2011

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics North Animal Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.627-642, 1990.

MAGGS, D.J.; MILLER, P.E.; OFRI, R.. Cornea and sclera. In: **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 5ed., Missouri: Elsevier Saunders, 2013. 520p.

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.

MOHAN, R.R.; STAPLETON, W.M.; SINHA, M.V.; NETTO, M.V.; WILSON, S.E. A novel method for generating corneal haze is anterior stroma of the mouse eye with the excimer laser. **Experimental Eye Research**, v.86, p.235-240, 2008.

MONTES, L.V.; BROSEGHINI, L.P.; ANDREATTA, F.S.; SANT'ANNA, M.E.S.; NEVES, V.M.; SILVA, A.G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.61- 67, 2009.

NOGUEIRA, E.O.; NOVAES, A. S. M.; SANCHEZ, C. M. S.; ANDRADE, C. M.; SILVA, M. F. A. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012.

OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C.; BARRIE, K.P.; KALLBERG, M.E. PLUMMER C.E., O'REILLY, S. Proteinases of the cornea and preocular tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, p.199-206, 2007

PERCHES, C.S.; BRANDÃO, C.V.S.; RANZANI, J.J.T.; ROCHA, N.S.; SERENO, M.G.; FONZAR, J.F. Matriz metaloproteinases na reparação corneal. Revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p.480-489, 2012a.

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

PISO, D.Y.T. Efeitos de preparação antiproteolíticas no tratamento da ceratite ulcerativa experimental em ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*, LINNAEUS, 1758). 2011. 49F. Tese (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA JUNIOR, V.F.; ROCHA, W.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.733-738, 2008.

WALDE, I.; SCHÄFFER, E. H.; KÖSTLIN, R. G. **Atlas de clínica oftalmológica do cão e do gato**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 4.

WILCOCK, B. P. Eye, eyelids, conjunctiva and orbit. In: Mc. MAGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of Veterinary Disease**. St Louis: Mosby, 2007. p.1349-1413

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.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H. *et al.* Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chem. Biol. Interact.*, v.189, p.82-89, 2011.