CAMILE GIARETTA SACHETTI

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA EM RATOS: ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE E EMBRIOFETOTOXICIDADE

Brasília-DF, 2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAMILE GIARETTA SACHETTI

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA EM RATOS: ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE E EMBRIOFETOTOXICIDADE

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profª. Drª. Eloisa Dutra Caldas

Brasília-DF
2010

CAMILE GIARETTA SACHETTI

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA EM RATOS: ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE E EMBRIOFETOTOXICIDADE

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde da Universidade de Brasília

Aprovado em 28 de janeiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profª. Drª. Eloisa Dutra Caldas

Dra. Laila Salmen Espíndola

Dr. Albino Verçosa de Magalhães

Membro Interno do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr. Maurício Homem de Mello

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus por sua presença constante nos momentos difíceis e alegres.

À Orientadora Eloisa Dutra Caldas, principal responsável pela realização deste projeto. Agradeço por ter confiado no meu trabalho, desenvolvendo minha capacidade científica e acima de tudo por sua amizade.

À minha família pelo apoio em meu crescimento profissional, incentivo e amor.

Ao Dr. Francisco José Roma Paumgartten, por me receber na Fundação Oswaldo Cruz e dedicar seu tempo para apoiar o presente trabalho.

À Rosângela Ribeiro de Carvalho por transmitir seu conhecimento com dedicação e exclusividade, demonstrando sempre a importância e seriedade do estudo e o amor a pesquisa.

À colaboradora Maria Luiza Fascineli pelo auxílio técnico durante a realização do projeto.

À estagiária Juliana Alves Sampaio, que não mediu esforços em contribuir para a efetiva realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Andréia Nunes Oliveira Jardim, Denise Carvalho de Mello e Juciê Roniery Costa Vasconcelos Silva pelo apoio técnico no Laboratório de Toxicologia da UnB.

Aos colegas Érica, Lilian, Juliana, Bruno, Márcia, Maristela e Willian do Laboratório de Toxicologia pela amizade e apoio.

À profa. Fabiana Pirani Carneiro do Laboratório de Patologia da UnB, pelas análises histológicas.

Aos médicos veterinários da Cirurgia Experimental da UnB, Helenira Melo de

Moura, Rafael Andrade Rocha, Gabriela Mariângela Farias de Oliveira, e aos amigos José Tavares e Maria Fernanda da Conceição que nunca mediram esforços em me auxiliar nos procedimentos com os animais.

À profa. Vânia Maria Morais Ferreira e à Greice Lucena que me auxiliaram em algumas técnicas no teste piloto com os animais.

Ao prof. Antônio Sebben do Laboratório de Toxinologia da UnB por conceder temporariamente a lupa necessária para as análises.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira da Embrapa Amazônia Oriental, por conceder as amostras de copaíba.

Aos amigos Andréia, Pedro e Liane Jardim, minha família em Brasília, por me receberem em sua casa e me apoiarem em todos os momentos alegres e difíceis.

Aos queridos amigos Bianca Frederico, Leandro Rodrigues e pelas irmãs Carolina Bohorquez Herrera e Luciana Braga, pela sincera amizade e companheirismo.

À indústria de medicamentos Prati, Donaduzzi & Cia Ltda, por ter me proporcionado a oportunidade de estar em Brasília.

À UnB pela oportunidade acadêmica na realização do mestrado, bem como o apoio financeiro.

Aos animais experimentais deste projeto, os ratos, que deram as suas vidas para realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra foram importantes para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

...

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem querer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO ____ *12*

Óleo-resina de copaíba ____ *15*

Propriedades farmacológicas do óleo-resina de copaíba ____ *17*

Estudos da toxicidade do óleo-resina de copaiba ____ *21*

Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos ____ *23*

REFERÊNCIAS ____ *27*

OBJETIVOS ____ *33*

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL NEUROTÓXICO DA COPAÍBA ____ *34*

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS MATERNOS DE RATOS EXPOSTOS À COPAÍBA ____ *52*

CAPÍTULO III: EMBRIOFETOTOXICIDADE DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA EM RATOS ____ *63*

CONCLUSÕES FINAIS ____ *91*

RESUMO

Conhecida popularmente como copaíba, o gênero *Copaifera L*., Fabaceae, é uma das plantas com uso medicinal mais conhecido e utilizado no Brasil. Embora haja vários estudos mostrando algumas das atividades farmacológicas desse óleo-resina, existem poucos trabalhos relacionados à sua toxicidade. No presente estudo, ratas Wistar foram expostas a diferentes doses do óleo-resina de *Copaifera reticulata,* via gavagem, dissolvida em Tween 80 2%, para se avaliar sua toxicidade aguda e neurotóxica, seu potencial tóxico durante o período gestacional e sua toxicidade embriofetal. O estudo de toxicidade oral aguda foi realizado com 15 ratas nulíparas distribuídas em grupos de doses únicas de 300 e 2000 mg/kg p.c., conforme o Guia OECD-423/2001. Uma hora após a administração, os animais foram avaliados quanto à função comportamental, motora e sensorial em Campo Aberto e em Labirinto em Cruz Elevado. A dose letal aguda foi estimada como maior que 2000 mg/kg p.c e não houve sinais clínicos de toxicidade ou neurotoxicidade, indicando uma baixa toxicidade aguda. A toxicidade do óleo-resina no desenvolvimento embriofetal em ratos foi avaliada de acordo com o Guia OECD- 414/2001. Ratos prenhes foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos de 25 fêmeas cada, e a partir do 6° dia de gestação (DG) iniciou-se a administração do óleo resina nas doses de 500, 1000 e 1250 mg/kg e grupo controle. No 20º DG, as fêmeas foram sacrificadas por inalação de CO_2. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso materno corpóreo; consumo de ração; peso do fígado, rins, cérebro e útero; número de reabsorções; número de corpos lúteos; número de fetos vivos e mortos; peso dos fetos e suas respectivas placentas; peso dos rins, baço, fígado, timo, coração e pulmão dos fetos; avaliação externa, visceral e esquelética da prole; e exame macro e microscópico do fígado, rim direito e esquerdo e cérebro das fêmeas adultas. Todos os animais sobreviveram nesse estudo, e nenhuma alteração comportamental foi evidenciada, bem como não foi encontrada qualquer alteração histopatológica significativa nos órgãos das fêmeas. O óleo-resina de copaíba foi tóxico para o organismo materno nas doses de 1000 e 1250 mg/kg, evidenciado pela redução no ganho de peso corpóreo e pela diminuição no consumo de ração. Nas maiores doses, o óleo-resina também afetou o desenvolvimento embriofetal, causando retardo no crescimento fetal, evidenciado pela diminuição do peso da prole. Uma ingestão oral segura de 5 mg/kg pc/dia para

mulheres gestantes foi estimada baseada no NOAEL de 500 mg/kg pc/dia. Não houve aumento da freqüência de malformações viscerais e/ou esqueléticas grosseiras nos fetos, indicando que o produto não é teratogênico em ratos.

Palavras-chaves: *Copaifera reticulata*; toxicidade aguda; toxicidade reprodutiva; ratos.

ABSTRACT

Popularly known as copaiba, the genus *Copaifera L.*, Fabaceae, is one of the medicinal plants most known and used in Brazil. Although there are several studies showing some of the pharmacological activities of this oil, there are few studies related to its toxicity. In this study, female Wistar rats were exposed orally to different doses of *Copaifera reticulata* oilresin, dissolved in Tween 80 2%, to evaluate its acute toxicity and neurotoxicity, its potential toxicity during pregnancy and embryofetal toxicity. The study was performed with 15 nulliparous female rats distributed in groups with single doses of 300 e 2000 mg/kg b.w., according to Guide OECD-423/2001. One hour after administration, the animals were evaluated for functional behavioral, motor and sensory function in open-field test and elevate plus-maze test. The acute lethal dose was estimated as greater than 2000 mg/kg b.w. and there were no clinical signs of toxicity or neurotoxicity, indicating a low acute toxicity. The toxicity of the oilresin on fetal development was evaluated according to OECD Guide 414/2001. Pregnat rats were randomly distributed in 4 groups of 25 females each, and the administration of the oleoresin began from 6th day of gestation (DG) in doses of 500, 1000 and 1250 mg/kg, plus the control group. In the 20th DG, the females were sacrificed by CO_2 inhalation. The following parameters were evaluated: maternal body weight; food intake; weight of liver, kidney, brain and uterus; number of resorptions, number of corpora lutea; live and dead fetuses; weight of fetuses and their placentas; weight of fetus kidneys, liver, spleen, thymus, heart and lung; external, visceral and skeletal evaluation of the offsprings. The liver, kidney and brain were examined visually and microscopically. All animals survived the study. No abnormal behaviour was observed and no significant pathological changes in the female organs were found. The copaiba oilresin was toxic to the female at doses of 1000 and 1250mg/kg as evidenced by decrease in body weight and decreased feed intake. At the higher doses, the oil-resin also affected the developing embryo, causing fetal growth retardation, evidenced by decreased in body weight of the offsprings. A safe oral dose of 5 mg/kg bw/day for pregnant human was estimated from a NOAEL of 500 mg/kg bw/day. There was no increased in the frequency of visceral and/or skeletal gross fetus malformations, indicating that the product is not teratogenic in rats.

Key-words: *Copaifera reticulata;* acute toxicity; reproductive toxicity; rats.

INTRODUÇÃO

A fitoterapia, prática da medicina tradicional ou popular usada como forma alternativa de cuidados com a saúde, aumentou consideravelmente nos últimos anos entre todos os grupos socioeconômicos da população, sendo atualmente um importante setor econômico no Brasil. O setor movimenta globalmente US$ 21,7 bilhões por ano e no Brasil estima-se que esse mercado gira em torno de US$ 160 milhões por ano (Carvalho et al., 2008). Grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulação industrializada. Em geral, essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa (Veiga Jr et al., 2005). Em muitos casos, essas plantas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas.

Numa pesquisa realizada nos Estados Unidos, Eisenberg et al. (1998) demonstraram que 42% da população havia feito em 1996 o uso de plantas medicinais, pelo menos uma vez ao ano, em tratamentos médicos alternativos. Esse percentual é cerca de 33,8% maior em relação ao ano de 1990, quando a mesma pesquisa foi realizada. Muitos países da Europa utilizam plantas medicinais de forma ampla, como a Alemanha e a França, que detém 39 e 29% do total de vendas de toda a União Européia, respectivamente. No caso do óleo-resina de copaíba, ela vem sendo exportada do Brasil principalmente para França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos (Veiga Jr. e Pinto, 2002). Na Alemanha, plantas medicinais são utilizadas pela população para tratar resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%), úlcera estomacal (36%), nervosismo (21%), bronquite (15%), doenças de pele (15%), fadiga e exaustão (12%) (Calixto, 2000).

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo, além de inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento tradicional das plantas medicinais

e tecnologia para correlacionar o saber tradicional e científico (Albuquerque & Hanazaki, 2006). Num estudo realizado no município de Campina Grande — Paraíba, 782 famílias foram visitadas para entrevista e coleta de plantas (Amorin, 1999). Em 82,9% delas, havia uma pessoa que era considerada "especialista", usando as plantas para sua família e para ela; 87,2% haviam aprendido sobre seu uso com a família. As plantas eram utilizadas para vários problemas, incluindo gastrointestinais (21,1%), garganta, nariz e pulmões (18,2%), febres e gripes (13,3%), psiconeurológicos (8,3%), cardíacos e circulatórios (6,5%). O chá foi citado como a forma mais freqüente de uso das plantas (63,4%).

Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram mais de 350 mil espécies vegetais, o que permite uma ampla variedade aos possíveis usos medicinais. Entre tantas espécies, apenas dez mil têm algum uso medicinal conhecido. Segundo de Mesquita et al. (2005), as populações das zonas rurais dependem da medicina tradicional para o tratamento de muitas doenças infecciosas. Entretanto, poucos estudos têm focalizado os fitoterápicos no âmbito dos estudos farmacoepidemiológicos (Brandão et al., 2006; Ribeiro et al., 2005). O desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das chamadas "doenças negligenciadas", tais como tuberculose, malária, mal de Chagas, esquistossomose e leishmaniose, pouco interessa à indústria farmacêutica. Estas doenças afetam, sobretudo, populações de países em desenvolvimento, que reúnem 80% da população mundial, mas correspondem a apenas 20% das vendas globais de medicamentos (Funari e Ferro, 2005).

Em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006) onde ficou estipulada a inserção de terapias alternativas e práticas populares (entre elas a fitoterapia) no Sistema Único de Saúde (SUS). Sendo assim, a necessidade de estudos toxicológicos e a implantação de políticas de fitofarmacovigilância devem ser tomadas como prioridade para a saúde pública.

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, porém, ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (Veiga Jr. et al., 2005). A normatização do registro de fitoterápicos é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Resolução

da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004 determina, entre outros, a necessidade de controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica. Outras resoluções sobre o tema incluem a RE nº 90 de 2004 (DOU Poder Executivo 29/04/04), com o ‘’Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos’’, que tem como objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica; a RE nº 88 de 2004 (DOU Poder Executivo 18/03/2004) que determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”; a RE n° 89 de 2004 que foi revogada pela Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008, que determina a publicação da "Lista de registro simplificado de fitoterápicos” e a RE n° 91 (DOU Poder Executivo 16/03/04) que determina a publicação do "Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós registro de fitoterápicos”.

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente tóxicas, e devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. Os efeitos adversos dos fitoterápicos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. O aumento no número de reações adversas é possivelmente justificado pelo aumento do uso dessas plantas (Gallo et al., 2000). Mais de 5000 suspeitas de reações adversas relacionadas ao uso de ervas foram informadas a Organização Mundial da Saúde (OMS) até 1996. Entre janeiro de 1993 e outubro de 1998, 2621 eventos adversos, incluindo 101 mortes, associadas com suplementos dietéticos foram informadas ao FDA, porém esses eventos adversos não foram bem reportados. Fatores que contribuem para não notificação desses eventos incluem o desconhecimento dos médicos associados ao uso de fitoterápicos e ao fato que os pacientes nem sempre informam o uso desses medicamentos durante a consulta (Adusumilli et al., 2002).

O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais. Entretanto, em muitos casos, não há respeito aos limites de uso dos fitoterápicos e não se fornecem informações sobre efeitos colaterais. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos, tornam-se cada vez mais importantes para a definição

dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Maciel et al., 2002).

Óleo-resina de copaíba

O óleo-resina de copaíba, também descrito como copaíba, copaíva ou pau-de-óleo, é amplamente conhecido no Brasil por sua atividade terapêutica baseada no uso popular. O óleo-resina é extraído do tronco das árvores do gênero *Copaifera L.*, pertencente à família Fabaceae Lindl, sub família *Caesalpinioideae* Kunth, encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil (Veiga Jr. e Pinto, 2002). Em 1996, o Index Kewensis apresentou 72 espécies do genêro *Copaifera*, sendo 16 somente no Brasil. A designação correta para o óleo da copaíba é a de óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (Bruneton, 1987 apud Veiga Jr. e Pinto, 2002).

As espécies do gênero *Copaifera,* em geral, são árvores com altura de 15 a 40 metros (Figura 1), casca aromática, folhagem densa, flores pequenas, frutos secos, do tipo vagem monospérmica e deiscente. As sementes são de cor preta, ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos (Rigamonte-Azevedo, 2004). Segundo alguns autores, o óleo-resina essencial funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias. Em todas as espécies, os canais secretores acham-se na região cortical dos caules, porém dispostos de modo que se prolonguem até o lenho, onde existem em notável abundância, formando bolsas (Corrêa, 1984).

Figura 1: *Copaifera* sp. (Foto: Ibama)

A Figura 2 mostra um exemplo do processo de coleta do óleo-resina, descrita em Oliveira et al. (2006). As árvores são perfuradas com um trado tradicional de 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento (Figura 2A), fazendo-se dois orifícios na altura de 1m e 1,50 m, respectivamente (Figura 2B). O orifício da árvore, após o completo escoamento do óleo-resina, é vedado com cano do tipo PVC com ¾ de diâmetro e 10 cm de comprimento contendo uma tampa de plástico visando facilitar as outras coletas e evitar resíduos de madeira (Figura 2C). As espécies mais freqüentemente utilizadas na produção do óleo-resina são *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) e *C. officinalis* (5%) (apud Veiga Jr e Pinto, 2002).

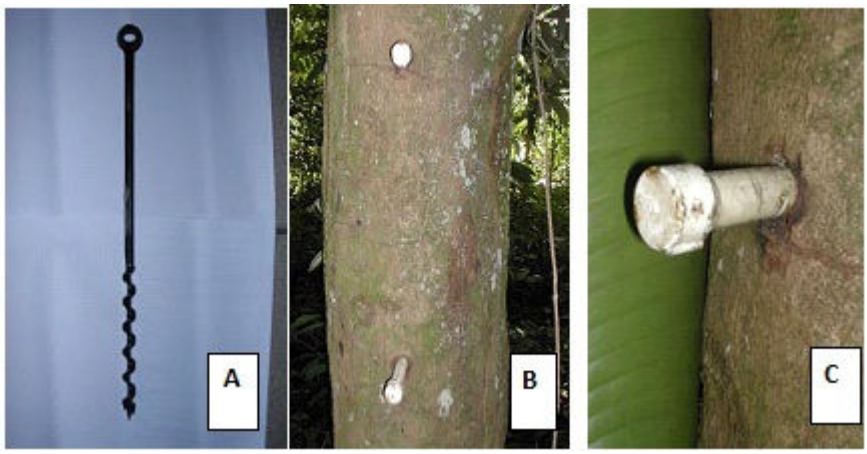


Figura 2. Processo utilizado na extração do óleo-resina de copaíba. Trado tradicional (A); Orifícios (B) e Cano PVC (C). Embrapa Amazônia Oriental, 2003. Fonte: Oliveira et al. (2006)

Estudos fitoquímicos realizados com o óleo-resina da *Copaifera* revelaram a presença de cerca de 72 sesquiterpenos e 20 diterpenos, mas uma diferença significativa na composição química ocorreu entre as espécies (Cascon e Gilbert, 2000; Pontes et al., 2003). A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie vegetal pode estar atrelada a sua sazonalidade, variando conforme o ambiente e fatores climáticos (Moraes e Bastos, 1972). Nas espécies de *Copaifera,* a concentração das substâncias pode variar em função da temperatura, radiação solar e precipitação pluviométrica, dentre outros fatores (Oliveira et al., 2006).

Propriedades farmacológicas do óleo-resina de copaíba

As propriedades farmacológicas do óleo-resina de copaíba têm sido bastante estudadas e incluem sua ação antiinflamatória (Carvalho et al., 2005; Veiga Jr et al., 2007), antitumoral (Lima et al., 2003), antimicrobiana (Tincusi et al., 2002), antinociceptiva (Gomes et al., 2007), antioxidante (de Lima Silva et al., 2009) e antiparasitária, principalmente contra o parasita Leishmania (Santos et al., 2008b).

Fernandes et al. (1992) avaliaram o efeito antiiflamatório e analgésico do óleo-resina da *Copaifera cearensis*, comparando-a com a indometacina e com outros derivados isolados do óleo-resina como o ácido copálico, o éter metílico do àcido solidago e bisabolol. Os resultados demonstraram que o óleo-resina de copaíba

possui atividade antiinflamatória e analgésica maiores que aquelas dos três compostos estudados isoladamente, porém menor que a indometacina. Basile et al. (1988) estudaram a atividade antiinflamatória do óleo-resina em ratos utilizando diversos modelos, como inibição de edema induzido por carragenina, inibição de formação de granuloma “Cotton-pellet” e aumento de permeabilidade vascular. O estudo foi realizado com óleo-resina comercial, sem identificação botânica da espécie. Os resultados indicam que o óleo-resina possui atividade antiinflamatória e baixa toxicidade (DL50 3790 mL/kg p.c.). Efeitos adversos como irritação gastro-intestinal, diarréia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central foram observadas nas doses mais altas.

Vieira et al. (2008) avaliaram o efeito do tratamento tópico com *C. langsdorffii* no processo de reparo quando um corpo estranho é o indutor da inflamação. Para isso, 60 camundongos da linhagem BALB/c foram submetidos à incisão cirúrgica linear de 1 cm no dorso para realizar o implante de uma lamínula de vidro com 12 mm de diâmetro no tecido subcutâneo. Quatro tratamentos para a ferida foram estabelecidos: controle (C) tratado com solução salina estéril; controle veículo (CV) tratado com óleo mineral estéril; tratamento 1 (T1) tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo-resina de *C. langsdorffii;* tratamento 2 (T2) tratado com óleo-resina de *C. langsdorffii* puro. As avaliações foram realizadas em períodos de 1 a 14 dias. Foram verificadas características da fase proliferativa como a reepitelização, a presença de fibroblastos e a neovascularização, porém os grupos tratados com o óleo (T1 e T2) não apresentavam reepitelização aos três dias. Esses grupos aos 5 e 7 dias apresentavam no exame macroscópico maior intensidade de edema, hiperemia e permanência de crostas. Na microscopia, a reepitelização ainda não estava completa e a crosta era serocelular. Nos grupos C e CV, apesar de discreta, era predominante a presença de mononucleares, enquanto nos grupos T1 e T2 o infiltrado inflamatório era misto e com maior intensidade que nos outros grupos. Quatorze dias depois da incisão cirúrgica, os aspectos macroscópicos dos grupos C e CV eram semelhantes e os grupos T1 e T2, apesar de a ferida estar completamente fechada e sem crostas, a pele desses animais estava espessada e na derme do grupo T2 parecia ter fibrose mais acentuada do que nos outros grupos. Neste estudo, os resultados demonstraram que o tratamento tópico com óleo-resina de *C. langsdorffii* prejudicou o processo de reparação normal de ferida na presença de corpo estranho.

Estevão et al. (2009) avaliaram morfometricamente a neoangiogênese de retalhos cutâneos subdérmicos em ratos tratados com óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em pomada a 10%. Trinta ratos Wistar foram submetidos à elevação do retalho cutâneo dorsal subdérmico e distribuídos em três grupos: grupo controle absoluto, no qual os animais não receberam nenhum tratamento; grupo controle, no qual os animais receberam tratamento tópico diário com pomada com apenas veículo (glicerina e vaselina); e grupo tratado, no qual os animais foram tratados diariamente com óleo-resina de copaíba em pomada a 10%. Os ratos foram tratados e observados por oito dias após o ato operatório. No oitavo dia de pós-operatório, realizou-se a análise macroscópica do retalho e foram coletados fragmentos das porções cranial, média e caudal do retalho cutâneo para análise histopatológica. A análise morfométrica mostrou diferença significativa para o número de novos vasos sanguíneos nas partes média e caudal do retalho cutâneo no grupo tratado. Neste caso, óleo-resina de copaíba mostra-se eficiente no aumento da neoangiogênese em retalhos cutâneos subdérmicos de ratos.

Brito et al. (2005) demonstraram a proteção da *Copaifera multijuga* Hayne na função renal de ratos submetidos a isquemia e reperfusão, apresentando diminuição nos níveis de creatinina e uréia após 48 horas de exposição. A atividade gastroprotetora do óleo-resina (*Copaifera langsdorffii*) foi verificada em estudo conduzido em ratos por Paiva et al. (1998). A administração oral do óleo-resina nas doses de 200 e 400mg/kg promoveu uma proteção dose dependente contra as lesões gástricas provocadas por etanol e nas doses de 400mg/kg também preveniu a ulceração gástrica induzida por indometacina. Essa atividade gastroprotetora se deve à diminuição de acidez gástrica, provavelmente através da promoção da secreção de muco gástrico e bicarbonato.

A *Copaifera multijuga* Hayne foi avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. As placas foram incubadas em estufas por 24 h em temperatura de 35 ºC. Como padrões foram utilizados os antibióticos amoxicilina (AMO-10 mg/disco), cloranfenicol (CLO-30 mg/disco) e tetraciclina (TET-30 mg/disco). Os resultados mostraram que o óleo-resina de copaíba possui capacidade de inibir o crescimento das três bactérias avaliadas, apresentando uma concentração inibitória mínima de 1,56, 3,12 e 12,5% para *E. coli, S. aureus* e *P. aeruginosa*,

respectivamente (Mendonça e Onofre, 2009).

Vasconcelos et al. (2008) formularam um cimento odontológico obtido da associação do ZnO, $Ca(OH)_2$ e óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne para avaliar a atividade antibacteriana através do teste de diluição em meio líquido frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *S. sanguinis* (ATCC 15300). Nesse ensaio, utilizaram-se os seguintes grupos experimentais: o cimento contendo ZnO, $Ca(OH)_2$ e óleo-resina de copaíba (G1), ZnO (G2), $Ca(OH)_2$ (G3) e óleo-resina de copaíba (G4). Todos os grupos analisados demonstraram atividade antibacteriana, o G4 apresentou os melhores resultados e o G1 mostrou-se um cimento promissor a ser utilizado em odontologia.

A atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba também foi testada contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e dermatófitos. Os óleos obtidos da *Copaifera martii, Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata* foram ativos contra as espécies Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, meticilina resistente *S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis*, e *Enterococcus faecalis*) com concentração mímina inibitória na faixa de 31,3-62,5 µg/mL. Os óleos amostraram atividade bactericida, diminuindo a viabilidade das bactérias Gram-positivas em 3 horas. Atividade moderada foi observada contra os fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. A microscopia eletrônica das colônias de *S. aureus* tratados com o óleo-resina obtido do *C. martii* revelou lise das bactérias, causando aglomerados celulares. Microscopia de transmissão eletrônica revelou lesão na parede celular, resultando na liberação de compostos citoplasmáticos, alterações na morfologia e uma diminuição no volume da célula, indicando que o óleo-resina de copaíba pode afetar a parede celular (Santos et al., 2008a).

A atividade larvicida de diterpenos isolados do óleo-resina de *Copaifera reticulata* sobre *Aedes aegypti*, principal vetor de dengue e febre amarela urbana também foi avaliada por Geris et al. (2008). Quatro diterpenóides foram obtidos a partir da extração do óleo-resina com solventes orgânicos e, subseqüentes procedimentos cromatográficos e espectroscópicos permitiram o isolamento e a identificação desses compostos como ácido 3-β-acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-óico (1), ácido alepterólico (2), ácido 3-β-hidroxylabdan-8(17)-en-15-óico (3) e ácido *ent*-agático (4). Cada um desses compostos foi previamente solubilizado em

dimetilsulfóxido, acrescentando-se água, até se obterem as concentrações desejadas. Em cada bioensaio foram utilizadas 20 larvas de 3° estádio de *Ae. aegypti* colocadas em 25 mL da solução-teste. Foram feitas cinco repetições, e a mortalidade avaliada 48 h após a exposição, indicada pela ausência de movimentos e escurecimento da cápsula cefálica. Os dados obtidos da mortalidade x concentração (ppm) foram analisados, em gráfico de Probit para avaliar as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}). Este estudo revelou que os diterpenóides 1 e 2 mostraram atividade larvicida com CL_{50} de 0,8 e 87,3 ppm, respectivamente, sendo o diterpeno 1 o composto mais promissor a ser usado como larvicida para o controle de *Aedes aegypti*.

Silva et al. (2007) avaliaram a atividade larvicida das frações do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) em larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti*, na busca de alternativas para o controle desse mosquito. As frações bioativas foram monitoradas quimicamente através de cromatografia de camada delgada, analisada por ressonância magnética nuclear (^{1}H e ^{13}C) e espectrometria de massa. As frações mais ativas foram CRM_{1-4} (sesquiterpenos) e CRM_{5-7} (diterpeno labdano), que mostraram os valores de CL_{50} de 0,2 e 0,8 ppm, respectivamente.

Gomes et al. (2007) realizaram um estudo para verificar a atividade antinociceptiva do óleo-resina (*C. multijuga* Hayne). O estudo foi conduzido com camundongos machos Swiss, administrando-se via oral de 1 a 150 mg/kg de copaíba. Os resultados demonstraram que o óleo-resina de copaíba apresentou atividade antinociceptiva periférica e central provavelmente através de receptores opióides. Entretanto, não foram observados durante os 5 dias após a dosagem nenhuma alteração comportamental, perda dos reflexos da luz, aumento ou diminuição da respiração e ingestão de água e comida e lesões ou hemorragias no estômago.

Estudos da toxicidade do óleo-resina de copaiba

Poucos estudos para avaliar o potencial tóxico do óleo-resina de copaíba têm sido conduzidos e nenhum avaliou sua toxicidade durante o desenvolvimento embriofetal de maneira a garantir a utilização segura por gestantes.

Souza Jr. et al. (2002) analisaram o efeito intra-cavitário da copaíba (*C. multijuga, Hayne*) em ratos, infundido na cavidade peritoneal dos animais 0,5mL/kg pc do óleo-resina. Os resultados demonstraram fígado, estômago, baço e ceco aderidos em 80% dos animais, possivelmente explicadas pela ação cáustica irritativa do óleo. Além disso, 80% dos animais apresentaram abcessos de até 2 mm de diâmetro, principalmente no intestino, fígado e parede abdominal, o qual se deveu, segundo os autores, pela dificuldade de absorção do óleo-resina de copaíba.

O óleo-resina da *Copaifera duckei* não produziu efeitos mutagênicos nas células da medula óssea ou em reticulócitos periféricos, mas mostrou atividade citotóxica em doses elevadas (Maistro et al., 2005). Para avaliar a mutagenicidade, ratos foram tratados com doses de 10, 25 e 50% da dose da DL50 (7467 mg/kg p.c.) do óleo-resina por 3 dias consecutivos e coletado sangue periférico em 0, 24, 48 e 72 h para análise dos micronúcleos. Nas três concentrações e nos três intervalos de tempo testados não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na média do número de reticulócitos micronucleados e no número de aberrações cromossomais comparados com o controle negativo. No entanto, em 25 e 50% da dose de DL_{50} do óleo-resina apresentou uma diminuição significativa no índice mitótico quando comparado com o controle. A caracterização química do óleo-resina revelou a presença de sesquiterpenos hidrocarbonados e um diterpeno ácido não identificado.

Basile et al. (1988) num estudo para demonstrar a ação antiinflamatória de óleos comerciais de copaíba, estimaram sua DL_{50} em 3,8 mL/kg p.c. Estudos conduzidos com várias espécies de copaíba realizados em camundongos também reportam uma baixa toxicidade aguda desta planta. Num estudo conduzido por Fernandes et al. (1992) com *Copaifera cearensis,* camundongos foram expostos a doses de 1250, 2500, 3700 e 5000 mg/kg p.c. de óleo-resina (10 animais de ambos os sexos/grupo), e a DL_{50} estimada em 3090 mg/kg p.c. Gomes et al. (2007) estimaram a DL_{50} de *Copaifera reticulata* e *Copaifera multijuga* em camundongos em 3900 mg/kg pc e 4300 mg/kg p.c., respectivamente.

Até o momento da conclusão desta dissertação, não existiam na literatura estudos disponíveis sobre o potencial embriofetotóxico da copaíba em ratos. Costa-Lotufo et al. (2002) verificaram o potencial embriotóxico e citotóxico do àcido

caurenóico, um diterpeno encontrado abundantemente nas espécies de C*opaifera*. A exposição contínua (30 horas) de àcido caurenóico no desenvolvimento embrionário de ouriços do mar, iniciando após a fertilização, inibiu a primeira clivagem (IC_{50}: 84,2 µM) e progressivamente induziu destruição embrionária (IC_{50}: 44,7 µM e <10 µM para blástula e estágio de larva, respectivamente). Por outro lado, o ácido caurenóico inibiu o crescimento de células leucêmicas (CEM), células do câncer de mama (MCF-7) e células do câncer de cólon (HCT-8).

Cunha et al. (2003) isolaram o diterpeno ácido caurenóico da *Copaifera langsdorffii* e analisaram sua ação no músculo uterino de ratos, reportando propriedades de relaxamento uterino causados principalmente através do bloqueio do transporte de cálcio e em parte, pela abertura dos canais de potássio ATP-sensíveis. Brito et al. (2000) estudaram os aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após a aplicação do óleo-resina de copaíba, administradas via vaginal na dose de 0,3 mL, diariamente, uma vez ao dia até os dias determinados para o sacrifício (7°, 14° e 21° dia do estudo). O colo uterino dos animais dos grupos controles (água e óleo de milho) mostraram epitélio atrófico de 1 ou 2 fileiras de células em todos os dias analisados (7º, 14º, 21º dia do estudo). Foram observadas no colo uterino de fêmeas tratadas um epitélio exuberante, pavimentoso, estratificado e queratinizado nos mesmos dias analisados. Segundo os autores, este epitélio exuberante não devia estar presente, pois as ratas não estavam sob ação de estrogênio para induzir tal epitelização, sugerindo que o óleo-resina de copaíba pode ter agido por um efeito pseudo-hormonal, por ação sistêmica, ou por irritação tópica. Os autores sugerem que outros modelos experimentais são necessários para comprovar estes efeitos, assim como conhecer melhor as propriedades do óleo-resina.

Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos

A gestação é uma condição fisiológica na qual o metabolismo materno pode ser influenciado por agentes tóxicos, que poderão afetar o sucesso da implantação, desenvolvimento e crescimento do feto (Daruich et al., 2001). Nesse período, os

mecanismos metabólicos de alguns órgãos os tornam mais susceptíveis a lesões, além da função materna normal ser indispensável para o desenvolvimento adequado dos fetos e para a saúde da prole. A resposta fetal pode ser diferente da resposta materna, podendo ocorrer toxicidade embriofetal. A exposição pré-natal em testes com animais prenhes pode incluir avaliação dos efeitos maternos bem como a morte, anormalidades estruturais, ou alteração no crescimento dos fetos (*OECD Guideline for the Testing of Chemicals- TG 414, 2001*).

A toxicidade reprodutiva se refere a algum tipo de interferência na capacidade reprodutiva de machos e/ou fêmeas (incluindo o desenvolvimento pré-natal) provocada por um agente toxicante. Alterações específicas, como anomalias congênitas, podem ocorrer espontaneamente (mutações causadas por fatores endógenos) ou pela influência de substâncias tóxicas (efeitos teratogênicos). Entretanto, a incidência de anomalias espontâneas é prevista dentro das espécies de animais modelo, como também para a espécie humana (EPA, 1996).

Agências regulatórias e indústrias farmacêuticas e químicas despendem um grande esforço e recursos para avaliar os efeitos dos medicamentos e produtos químicos no desenvolvimento humano. Para prevenir tragédias como a da talidomida, estudos de toxicidade do desenvolvimento pré-natal são conduzidos em animais de laboratório como parte da avaliação toxicológica de medicamentos, pesticidas e produtos químicos industriais. Estes estudos são destinados a identificar os produtos químicos que são potencialmente perigosos para o concepto em desenvolvimento e fornecem dados adequados para a extrapolação das informações obtidas a partir de estudos em animais de laboratório para o perigo a saúde humana e avaliação de risco (Daston and Seed, 2007).

Os estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva de fármacos consistem em ensaios realizados em animais, a fim de verificar o potencial de uma substância química nova em provocar efeitos adversos sobre o processo reprodutivo, incluindo a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embriofetal, o parto, e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva. É uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, porque o ciclo reprodutivo prolonga-se por grande parte da vida do indivíduo, iniciando-se com a produção dos gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguindo pela fertilização e

desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual quando os descendentes, já adultos, tornam-se capazes de procriar. As diretrizes metodológicas, embora não possuam força de lei, traduzem as expectativas das agências regulatórias e por isto são seguidas à risca pelas indústrias. As diretrizes da Agência Americana de Controle de Medicamentos FDA (US Food and Drug Administration, 2001), e da União Européia, EEC (European Economic Community) recomendam a realização de abrangentes estudos de toxicidade reprodutiva em três segmentos (Figura 3), como segue:

a) segmento I – de toxicidade crônica: avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, sendo os machos tratados antes e durante o acasalamento e as fêmeas durante gestação e lactação;

b) segmento II – de teratogenicidade: avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese;

c) segmento III – de toxicidade peri e pós-natal: avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

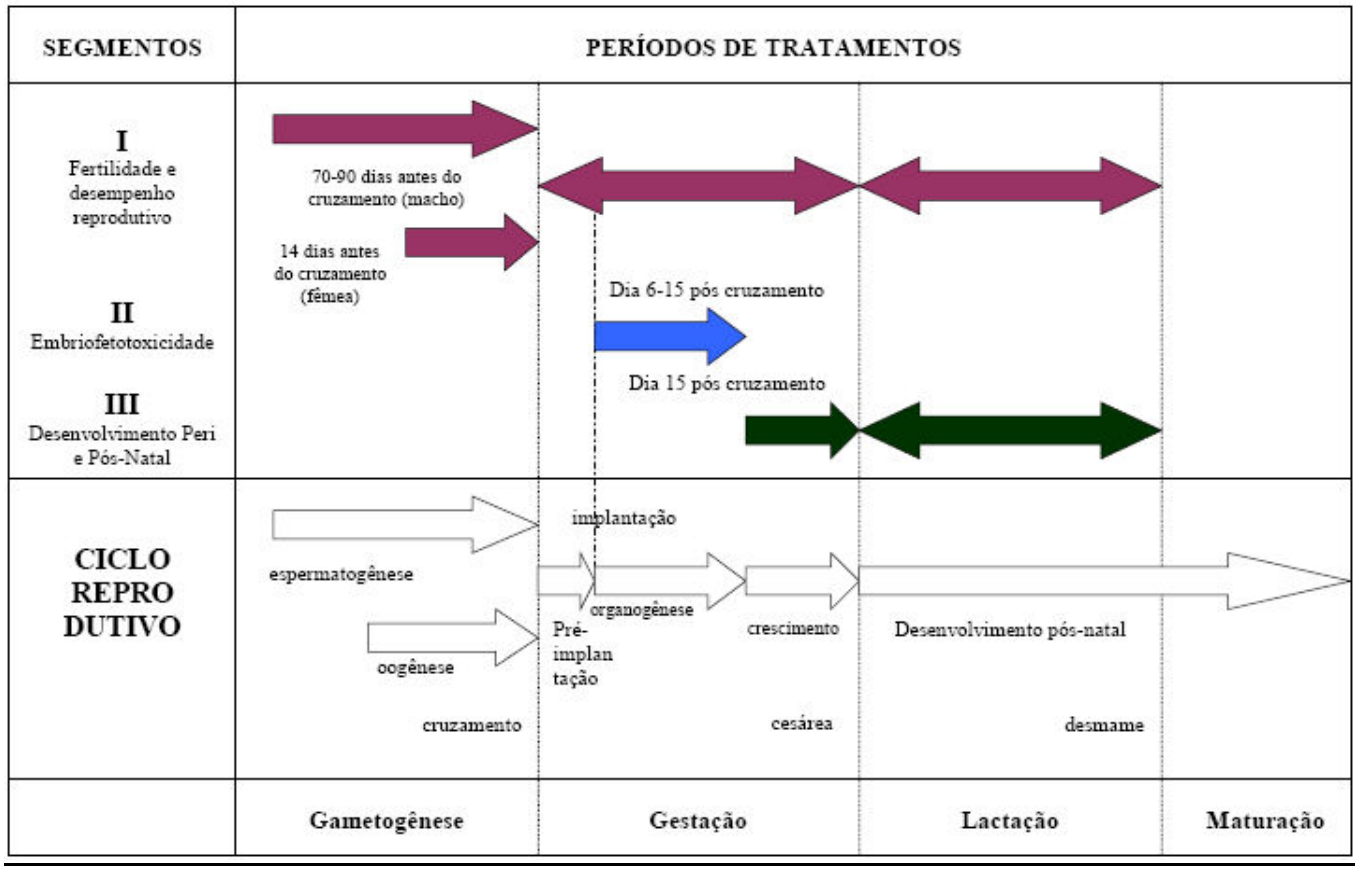


Figura 3: Esquema geral dos estudos de Toxicidade Reprodutiva, denominados Segmentos I, II e III.

Simultaneamente a criação das diretrizes harmonizadas, observou-se por parte da comunidade científica e órgãos regulatórios uma maior preocupação com possíveis sequelas funcionais induzidas *in utero*. Neste contexto, a avaliação de toxicidade funcional, que em geral inclui a avaliação de possíveis efeitos sobre o desenvolvimento neurocomportamental e da função reprodutiva. Tais avaliações incluem: atividade locomotora, teste de memória, desenvolvimento de reflexos, maturação do tempo sexual, acasalamento e fertilidade ("Reviewer Guidance" - FDA, 2001). O Brasil não participa ativamente deste Fórum, podendo ser considerado apenas como país observador, que procura seguir as recomendações contidas nas diretrizes ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) sobretudo nos casos em que não possui regulamentação própria.

REFERÊNCIAS

Adusumilli PS, Lee B, Parekh K, Farrelly PA 2002. Acalculuos eosinophilic cholecystitis from herbal medicine: A review of adverse effects of herbal medicine in surgical patients. *Surgery 131*:352-356.

Albuquerque UP, Hanazaki N 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e pespectivas. *Rev Bras Farmacogn 16 (Supl.):* 678-689.

Basile AC, Sertié JA, Freitas PCD, Zanini AC 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian copaifera. *J Ethnopharmacol* 22: 101-109.

Brandão MGL, Acurcio FA, Montemor RLM, Marlière LDP 2006. Complementary/alternative medicine in Latin America: use of herbal remedies among a Brazilian metropolitan area population. *J Complement Integrative Medicine 3*: 501-512.

Brasil 2006. 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. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de junho 2006.

Brito NMB, Kylay-Jr L, S MJL, Osmar A, Lamarão LG, Damous SHB 2000. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba / Morphological and morphometric aspects of the uterine cervix in oophorectomized rats after copaíba oil application. Rev bras ginecol obstet 22(8):489-93.

Brito VHB, Moreira RJ, Tavares MLC, Carballo MCS, Carneiro TX, Santos AAS 2005. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir Bras* 20: 243-246.

Calixto JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 33(2): 179-89.

Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacog* 18(2): 314-319.

Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B 2005. Topical antiinflamatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950.

Cascon V and Gilbert B 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochem* 55: 773-778.

Corrêa PM 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura 6: 612-615.

Costa-Lotufo LV, Cunha GM, Farias PA, Viana GS, Cunha KM, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Gramosa NV, Rao VS 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40(8): 1231-234.

Cunha KMA, Paiva LA, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS 2003. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on the rat uterus in vitro. *Phytother Res* 17: 320-324.

Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS 2001. Effect of the herbicide Glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* 85: 226-231.

Daston GP and Seed J 2007. Skeletal Malformations and Variations in Developmental Toxicity Studies: Interpretation Issues for Human Risk Assessment. *Birth Def Res (Part B*) 80:421–424.

De Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PR, Lima GG, Torres SM, de Vasconcelos RC 2009. Effects of *Copaifera langsdorffii Desf*. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg* 33(1):104-9.

de Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, de Paula JE, Grellier P, Espindola LS 2005. Antileishmanial and trypanocidal of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 (7): 783-87.

EPA-Environmental Protection Agency (1996), *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment* – EPA/630/R-96/009, p. 1-162.

Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA* 280(18):1569-75.

Estevão LRM, de Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratella-Evêncio L, Guimarães EC, da Câmara CAG, Evêncio-Neto J 2009. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesq Agropec Bras* 44(4):406-412.

FDA (Food and Drug Administration), 2001. Reviewer Guidance. Integration of study results to assess concerns about human reproductive and developmental toxicities. CDER (Center for Drug Evaluation and Research).

Fernandes RM, Pereira NA Paulo LG 1992. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). *Rev Bras Farm* 73: 53-56.

Funari CS e Ferro VO 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacogn* 15(2):178-182.

Gallo M, Sarkar M, Au W, Pietrzak K, Comas B, Smith M, Jaeger TV, Einarson ARN, Koren G 2000. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. *Arch Intern Med* 160:3141-3143.

Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG 2008. Diterpenos de *Copaifera reticulata* Ducke com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 50(1):26-28.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol* 109 (3): 486-492.

Index Kewensis, suppl. XX; Claredon Press: Oxford, 1996.

Lima SRM, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 17: 1048-1053.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Martins JR, Grynberg NF, Echevarria A, Lapa AJ, Vanderlinde FA 2002. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a

modern health system, Phytochem. Pharmacol. II Ser. *Recent Prog. Med. Plants 8*: 459-475.

Maistro EL, Carvalho JCT, Cascon V, Kaplan MAC 2005. In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. *Genet Mo Biol* 28(4):833-838.

Mendonça ED, Onofre SB 2009. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev Bras Farmacogn* 19(2):577-581.

Moraes VHF, Bastos, TX 1972. Viabilidade e limitações climáticas para as culturas permenentes, semi permanentes e anuais, com possibilidade de expansão na Amazônia. In: Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuário do Norte (Belém, PA). Zoneamento agrícola da Amazônia: 1ª aproximação. Belém, p. 123-53. (IPEAN. Boletim Técnico, 54).

OECD's Guideline for the Testing of Chemicals – n° 414: "Prenatal Developmental Toxicity Study'' (Adopted: 22nd January 2001).

Oliveira ECP, Lameira OA, Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. *Rev Bras Pl Med* 8(3):14-23.

Pontes AB, Correia DZ, Coutinho MS, Mothé CG 2003. Emulsão dermatológica à base de copaíba. *Rev Analytica* 7:36-42.

Paiva LA, Rao VS, Gramosa NV, Silveira ER 1998. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol* 62(1):73-8.

Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Resolução RE nº 88 de 16 de março de 2004 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Resolução RE n° 89 de 16 de março de 2004 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004), revogada pela Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 12 de dezembro de 2008). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Ribeiro AQ, Leite JPV, Dantas-Barros AM 2005. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev Bras Farmacogn 15*: 65-70.

Rigamonte-Azevedo AC, Wadt PGS, Wadt LH de O 2004. Copaíba: Ecologia e Produção de óleo-resina. Rio Branco: Embrapa Acre, 28 p.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Junior VFV, Pinto AC, Nakamura CV 2008a. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(3): 277-281.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV 2008b. Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis. *J Ethnopharmacol* 120(2):204-8.

Silva HHG, Geris R, Filho ER, Rocha C, Silva IG 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 40 (3): 264-267.

Souza Júnior OG, Guimarães Neto HP, Pinto NT, Santos MT, Carvalho RA 2002. Achados macroscópicos na cavidade peritoneal de ratos, após aplicação do óleo de copaíba. *Rev Par Med* 16: 14-18.

Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG, Hernández BV 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Plant Med* 68:808-812.

Vasconcelos KRF, Veiga Junior VF, Rocha WC. Bandeira MFCL 2008. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne*. Rev Bras Farmacogn* 18: 733-738.

Veiga Júnior VF, Pinto AC 2002. O gênero *Copaifera* L. *Quim Nova* 25: 273-286.

Veiga Júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM 2005. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Quim Nova* 28 (3): 519:28.

Veiga Júnior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 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 Ethnopharm* 112: 248-254.

Vieira RC, Bombardiere E, Oliveira JJ, Lino-Júnior RS, Brito LA, Junqueira-Kipnis AP 2008. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho *Pesq Vet Bras* 28(8): 358-366.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito de óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) durante o período gestacional em ratos após administração oral. Os objetivos específicos foram:

- Determinar a toxicidade oral aguda (DL50) do óleo-resina de copaíba em ratos fêmeas Wistar;
- Conduzir uma avaliação preliminar do potencial neurotóxico do óleo-resina após exposição aguda oral;
- Avaliar os efeitos histopatológicos do óleo-resina nos órgãos fígado, rins e cérebro de ratos durante o período gestacional.
- Investigar o potencial efeito tóxico do óleo-resina de copaíba no desenvolvimento embriofetal em ratos.

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de três trabalhos científicos que foram preparados para publicação em revistas indexadas:

1. **Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*C. reticulata*)**
   Aceito para publicação na "*Revista Brasileira de Farmacognosia''* em 28 de setembro de 2009. ISSN *0102-695X.*
2. **Avaliação histopatológica de órgãos maternos de ratos expostos ao óleo-resina de copaíba (*C. reticulata*)**
   A ser submetido no ''*Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*'' ISSN 1676-2444.
3. **Embriofetotoxicidade do óleo-resina (*C. reticulata*) de copaíba em ratos**
   A ser submetido ao Jornal ''*Reproductive Toxicology''*, ISSN 0890-6238.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL NEUROTÓXICO DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA (*C. RETICULATA*)

Camile Giaretta Sachetti[1], Maria Luiza Fascineli[2], Juliana Alves Sampaio[1], Osmar Alves Lameira[3], Eloisa Dutra Caldas[1*]

[1] Laboratório de Toxicologia, Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília (UnB), CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

[2] Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília, CEP 70919-970, Brasilia, DF

[3] Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental, CEP: 66095-100, Belém, PA.

***E-mail:** eloisa@unb.br; Tel.: 61- 3307 3671

Resumo: O óleo-resina de copaíba obtido da *Copaifera L.*, Fabaceae, é largamente utilizado na medicina popular como antiinflamatório, antimicrobiano e antitumoral. Porém, informações sobre seu potencial tóxico são escassos na literatura. O objetivo deste estudo foi estabelecer a toxicidade oral aguda e os possíveis efeitos neurotóxicos relacionados à ingestão do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae, em ratas Wistar. O estudo foi conduzido com 15 ratas nulíparas distribuídas nos grupos de doses 300 e 2000 mg/kg pc de óleo-resina administrado por gavagem. Os resultados obtidos mostraram que nestas doses não houve sinais clínicos de toxicidade ou neurotoxicidade, alteração no consumo de ração ou alteração no peso corpóreo. A dose letal aguda foi estimada como maior que 2000 mg/kg pc e classificada como categoria 5, segundo o Guia OECD 423. Estes resultados indicam que existe uma relativa margem de segurança para o uso do óleo-resina de copaíba como agente terapêutico, embora estudos toxicológicos adicionais sejam ainda necessários, principalmente com a administração repetida de baixas doses.

Unitermos: copaíba, ratos, toxicidade aguda, neurotoxicidade.

Abstract: "Assessment of the neurotoxic potential and acute toxicity of copaiba". Copaiba oil-resin obtained from *Copaifera L*. genus, Fabaceae, is largely used in popular medicine as antinflammatory, antimicrobial and antitumoral. Information concerning the potential toxicity of this oil is limited in the literature. The goal of this study was to investigate the acute toxicity and the possible neurotoxic effects related to the ingestion of *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae, oil-resin using female Wistar rats. Fifteen nulliparous rats were used and distributed in the experimental groups orally exposed to doses of 300 e 2000 mg/kg bw of oil-resin (gavage). No overt clinical signs of toxicity or neurotoxicity, alteration of food consumption or body weight were observed in the animals at the tested doses. The lethal oral toxicity was estimated to be higher than 2000 mg/kg bw, classified as category 5 according to OECD Guide 423. These results indicate that there is a certain safety margin associated with the use of copaiba as therapeutic agent, although additional toxicological studies are still necessary, mainly using repeated low doses.

Keywords: copaiba, rats, acute toxicity, neurotoxicity

Introdução

Procedimentos clínicos com plantas medicinais têm sido largamente utilizados desde os primórdios da história humana, muitas vezes sem restrições e de forma indiscriminada. A Organização Mundial da Saúde (2002) reconhece que até 80% da população de alguns países em desenvolvimento utilizam preparações de plantas medicinais para os cuidados básicos da saúde. É fundamental, porém, o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia da qualidade destas preparações, pois seu uso inadequado, sem o conhecimento toxicológico necessário, pode originar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos (Vendruscolo et al., 2005).

A copaíba é uma das plantas com uso medicinal mais utilizada e conhecida no Brasil (apud Veiga Jr. et al., 2002). São árvores nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental, popularmente conhecida como copaibeira ou pau d'óleo-resina. No Brasil, são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste. O gênero *Copaifera L*. pertence à família Fabaceae Lindl., sub família *Caesalpinioideae* Kunth (Veiga Jr. e Pinto, 2002). O óleo-resina utilizado nas preparações medicinais é um exsudado do tronco destas árvores, apresentando-se como um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom e constituído principalmente por misturas de sesquiterpenos e de diterpenos (Veiga Jr. e Pinto, 2002.).

O óleo-resina de copaíba pode ser encontrado nas farmácias de todo o país em diversas apresentações. O seu uso tem sido indicado, entre outros, pela sua ação antiinflamatória (Carvalho et al., 2005; Veiga Júnior et al., 2007), antitumoral (Lima et al., 2003), antimicrobiana (Santos et al., 2008; Tincusi et al., 2002) e atividade antinociceptiva (Gomes et al., 2007). Apesar da existência de estudos da ação terapêutica do óleo-resina de copaíba, os estudos de toxicidade deste produto são

escassos na literatura científica; alguns destes estudos obtiveram resultados contraditórios. Segundo Tisserand & Balancs (1995), apud Cavalini et al. (2005) não há relatos de toxicidade oral, cutânea ou fotossensibilidade devido à administração do óleo-resina de copaíba. A administração de 500 mg/kg peso corpóreo do óleo-resina (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) em camundongos por via oral não foi relacionada a alterações comportamentais, perda dos reflexos a luz, aumento ou diminuição da ingestão de água e ração e lesões ou hemorragias no estômago (Gomes et al., 2007). Por outro lado, Souza et al. (2000) observaram que a administração de 0,4 mL do óleo-resina pela via transdiafragmática ocasionou diarréia, piloereção e hemorragia nos animais tratados. Basile et al. (1988), realizaram estudos com a copaíba avaliando a atividade antiinflamatória em ratos e observaram alguns efeitos adversos como irritação gastrintestinal, diarréia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central (SNC). Embora esse estudo sugira ação da copaíba sobre o SNC, não foi encontrado até o presente momento estudos que avaliem a neurotoxicidade desta planta.

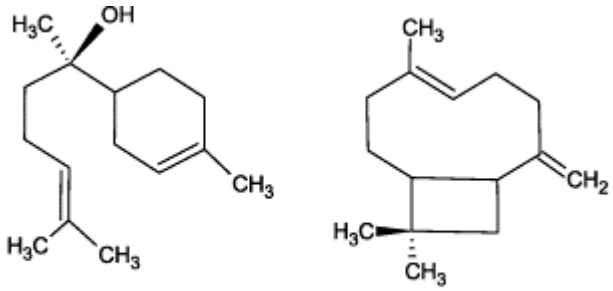
O objetivo do presente estudo foi estimar a toxicidade aguda (DL50) do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) em ratos após administração oral. Adicionalmente, se conduziu uma avaliação preliminar do potencial neurotóxico do óleo-resina nesses animais.

Material e Métodos

O experimento foi realizado com 15 ratas Wistar saudáveis, com idade entre 90 e 120 dias e com variação máxima de peso de 15% (270 ± 41g), provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília (UnB). Antes do início do estudo, os animais foram aclimatados no biotério na Faculdade de Ciências da Saúde da UnB

por um período de 15 dias. Os animais foram alocados individualmente em caixas de polipropileno, em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura (23 ± 2°C) e umidade relativa (70%) e receberam água potável e ração comercial Purina® *ad libitum*. O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UNB, cujo protocolo experimental adotado foi previamente aprovado pelo CEUA (protocolo aprovado n.°77333/2007).

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae*)* foi fornecido pela Embrapa Amazônia Oriental, sendo um *pool* de amostras extraídas de plantas do Campo Experimental do Mojú, PA, entre setembro de 2003 a agosto de 2004. O Campo se situa no km 30 da rodovia PA-150, entre as coordenadas geográficas de 2^{o} 08' 14" à 2^{o} 12' 26" de latitude sul e 48^{o} 47' 34" à 48^{o} 14" de longitude a oeste de Greenwich e altitude de 16 m, possuindo uma área total aproximada de 1.095 ha (Costa et al., 1998). As plantas possuíam cerca de 20m de altura, 260 cm de DAP (Diâmetro na Altura do Peito) e mais de 20 anos de idade. As concentrações de β cariofileno e β bisaboleno (Figura 1) foram de 45,4 e 12,3 %, respectivamente (Oliveira et al., 2006). A responsável pela identificação da espécie foi a Dra. Regina Celia Viana Martins da Silva da Embrapa Amazônia Oriental.



β-bisabolol β-cariofileno

Figura 1: Substâncias presentes na *C. reticulata*

O óleo-resina de copaíba foi diluído em solução Tween 80 2% e o volume final administrado foi fixado em 10 mL/kg peso corpóreo. Aos animais do grupo controle foram administrados 10 mL/kg de Tween 80 2%. Em todos os casos, a administração foi por gavagem (Figura 2).

Figura 2. Administração oral via gavagem do óleo-resina de copaíba.

A toxicidade oral aguda foi realizada conforme o Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) e o número de animais por dose (3 ratas) (Figura 3). A dose inicial selecionada para o estudo foi de 300 mg/kg pc, definida a partir de dados de estudos prévios com outras espécies desta planta (Ribeiro et al., 2007; Gomes et al., 2007). A próxima dose testada foi selecionada dependendo da mortalidade observada nas primeiras 24 horas de exposição. Cada dose foi testada duas vezes e, finalmente, foi estimada a categoria toxicológica, segundo as especificações do Guia.

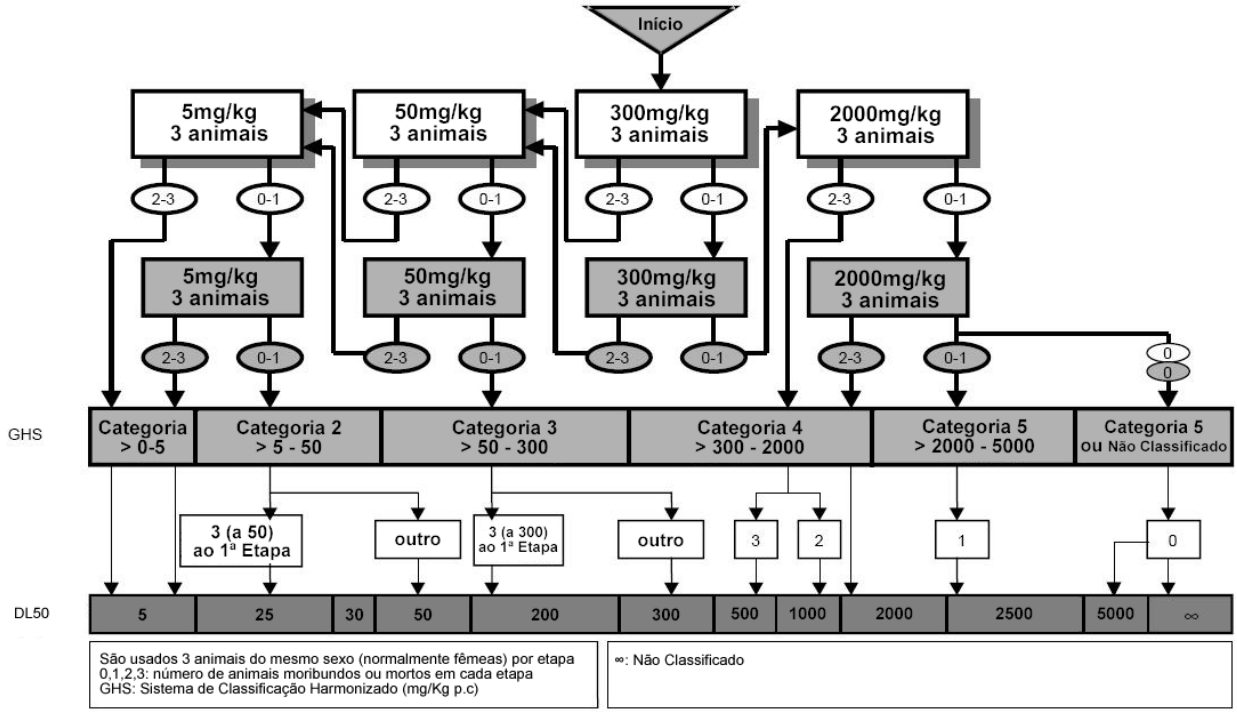


Figura 3: Etapas para o procedimento da toxicidade aguda, iniciando pela dose de 300mg/kg p.c. e usando 3 fêmeas por etapa, de acordo com o método “Toxicidade Aguda de Classe” baseado no Guia da OECD 423, 2001a.

Os animais ficaram em jejum por 10 horas anteriormente à administração do óleo-resina, com acesso livre apenas água, e a ração foi permitida 3 horas após a administração. O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração da copaíba, no 7° e no 14° dia pós-administração. Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pêlos, estresse, salivação, olhos, e comportamento.

Uma hora após a administração, os animais foram avaliados quanto à função comportamental, motora e sensorial para acessar os potenciais efeitos neurotóxicos. Os animais foram avaliados no Campo Aberto observando-se locomoção, tempo de parada, tempo de limpeza, freqüência de apoio, passagem pelo quadrante central, bolos fecais (por 5 minutos); Pinçamento da Cauda; Impressão Plantar; e Endireitamento Postural (Moser et al., 1997 a,b,c). Adicionalmente, foi realizada observação em Labirinto em Cruz Elevado, para avaliar o potencial efeito ansiolítico da copaíba, conduzido por 5 minutos segundo o aparato descrito por Handley e Mithani (1984).

No 14° dia, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2. Durante a necropsia, os órgãos da cavidade corpórea (pulmões, traquéia, coração, estômago, fígado, baço, rins, bexiga, intestino e timo), vísceras, glândulas, vasos, canais e diafragma foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência.

Para detectar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, com um nível de significância de 5%. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad

Software InStat® - version 3.0 (Motulsky, 1998).

Resultados e Discussão

Na menor dose testada (300 mg/kg pc), nenhum dos 3 animais expostos apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 horas após a exposição e durante o período do estudo. Desta forma, repetiu-se o teste nesta mesma dose com outros 3 animais, o que confirmou o resultado anterior. O teste foi então realizado na dose de 2000 mg/kg pc, onde não foi verificado morbidade ou mortalidade em nenhum dos 3 animais testados, resultado confirmado na replicata realizada utilizando-se a mesma dose. Com os resultados obtidos, observamos que a toxicidade oral aguda do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae, é maior que 2000 mg/kg pc e classificado como categoria 5, segundo os critérios do protocolo experimental adotado.

Os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (Valadares, 2006). Para que seus resultados sejam considerados pelas agências regulatórias dos países, é essencial que estes testes sejam conduzidos seguindo protocolos internacionalmente aceitos, como aqueles publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* - OECD). No presente estudo, adotou-se o Guia OECD 423 (OECD, 2001), que apresenta boa reprodutibilidade, usa poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System* - GHS). O Guia 423, juntamente com os Guias 420 e 425, substituiu o de número 401, introduzido há mais de 50 anos e banido definitivamente pela OECD em 2001. Este último, altamente

criticado pelas sociedades de proteção aos animais, determina estatisticamente a DL50 (dose que mata 50 % da população em estudo), a partir de estudos com grupos de animais (normalmente 20 animais de ambos sexos por grupo) expostos a doses crescentes da substância em estudo. Os protocolos atualmente preconizados pela OECD são de grande aceitação pelos órgãos reguladores na avaliação da toxicidade aguda para qualquer tipo de substância, e atende a requisitos da experimentação quanto aos princípios do bem estar animal.

O presente estudo foi o primeiro que avaliou a toxicidade letal aguda do óleo-resina de *Copaifera reticulata* em ratos. Estudos publicados conduzidos com esta e outras espécies de copaíba realizados em camundongos também reportam uma baixa toxicidade aguda desta planta. Num estudo conduzido por Fernandes et al. (1992) com *Copaifera cearensis,* camundongos foram expostos a doses de 1250, 2500, 3700 e 5000 mg/kg pc de óleo-resina (10 animais de ambos os sexos/grupo), e a DL50 estimada em 3090 mg/kg pc. Gomes et al. (2007) estimaram a DL50 de *Copaifera reticulata* e *Copaifera multijuga* em camundongos em 3900 mg/kg pc e 4300 mg/kg pc, respectivamente.

No presente estudo não foi observado sinais clínicos de toxicidade nos animais testados durante os 14 dias após a administração do óleo-resina. Também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal (Tabela 1) ou consumo de ração entre os animais das doses testadas (dados não mostrados).

Tabela 1: Média do peso corporal (gramas± desvio padrão) de ratas Wistar oralmente expostos ao óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) nas doses de 300 e 2000 mg/kg.

		Teste 1		**Teste 2**	
	Controle	**300 mg/kgpc**	**2000 mg/kgpc**	**300 mg/kgpc**	**2000 mg/kgpc**
Dia 0	281,3±1,5	250,3±1,5	261,3±6,4	264,3±8,1	293,0±8,9
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
Dia 7	293±1	258±8,5	273,3±21,2	266,3±11,7	303,0±5,0
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
Dia 14	293±8,2	257,3±8,4	279,0±12,7	267,6±6,6	305,0±4,6
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)

No intuito de averiguar a possível relação entre a substância testada e efeitos neurotóxicos, os animais foram avaliados quanto à função motora, sensorial e comportamental após 1 hora da administração do óleo-resina de copaíba. Para tanto, os animais foram observados no Campo Aberto, no Labirinto em Cruz Elevado, assim como, foram avaliados nos testes de Pinçamento da Cauda, de Endireitamento Postural e de Impressão Plantar. O teste de campo aberto é um dos instrumentos mais utilizados na avaliação comportamental e da função motora de animais. Dados como aumento do tempo despendido na parte central do campo aberto é indicação de ansiólise, locomoção aumentada pode ser um indicativo de um efeito estimulante, enquanto diminuição da locomoção e da freqüência com que o animal permanece sobre as patas traseiras é relatada como sedação (Prut e Belzung, 2003). Além disso, a ausência de movimento (tempo de parada) é um parâmetro utilizado como indicativo de alto nível de estresse e a defecação reflete o índice de emoção, sendo relacionada à ativação do sistema simpatomimético (Hall, 1934).

Na Tabela 2 estão sumarizados os resultados obtidos nos grupos experimentais. Não foram observadas alterações significativas dos parâmetros analisados entre os animais dos grupos testados e o controle, não indicando, portanto, alterações neurocomportamentais nos ratas. Esses resultados corroboram aqueles reportados por Ribeiro et al. (2007), que não verificaram quaisquer alterações no padrão de comportamento de roedores expostos ao óleo-resina e fração volátil de copaíba (espécie não informada) em doses crescentes de 50 a 800 mg/kg pc. Entretanto, Brito et al. (1999), observaram que a administração oral de 0,63 mL/kg do óleo-resina de copaíba, durante quatorze dias, foi capaz de promover irritabilidade nos ratos testados; a espécie de copaíba testada neste estudo não foi indicada pelos autores.

Tabela 2: Parâmetros de neurotoxicidade de ratas Wistar, 1 hora após administração oral de óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*).

	Controle n=3	**300 mg/kg n=6**	**2000 mg/kg n=6**
Campo aberto			
Locomoção, nº	41,3±9,6	42,0±8,2	28,7±9,3
Tempo de Parada (seg)	18,5±20,5	29,7±28,1	18,9±17,4
Tempo de Limpeza (seg)	17,4±6,6	16,9±13,1	15,0±9,1
Apoio Patas Traseiras (nº)	20,3±3,8	21,8±6,2	15,7±6,3
Quadrante Central (nº)	2,0±1,0	0,8±1,0	0,7±0,8
Bolos fecais (nº)	0,7±0,6	1,3±1,5	0,2±0,4
Pinçamento da cauda (mseg)	54,7±12,7	533,5±823,9	28,3±8,1
Impressão Plantar			
30 cm	100,6±10,9	85,9±9,4	90,6±20,7
40 cm	114,2±8,6	85,5±10,7	93,7±25,5
Endireitamento Postural (mseg)	48,0±1,7	38,8±1,5	38,7±3,7
Labirinto em cruz-elevada			
Braço Fechado (seg)	275,0±21,7	281,5±24,3	277,5±22,6
Braço Aberto (seg)	0,0±0,0	0,7±1,2	4,2±10,2
Braço Fechado (nº)	2,0±1,0	2,5±1,8	3,7±3,0
Braço Aberto (nº)	0,0±0,0	0,5±0,8	0,3±0,8

No 14º dia da administração do óleo-resina de copaíba, os animais foram submetidos à necropsia e avaliados quanto a alterações macroscópicas de diversos órgãos. Nenhuma alteração foi encontrada nos animais testados no estudo. Brito et al. (2001) reportou que a administração de 0,63 mL/kg pc em ratos por 14 dias consecutivos está relacionada a alterações gástricas, como diminuição das pregas da mucosa e diminuição de vasos congestos.

Conclusões

Os resultados de toxicidade aguda demonstraram que a administração do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) não causou mortalidade e/ou morbidade até a dose testada de 2000 mg/kg pc e foi categorizada como "categoria 5", ou seja, toxicidade letal aguda maior que 2000 mg/kg pc. O óleo-resina não apresentou efeitos neurotóxicos nas doses testadas, avaliada pela atividade motora, sensorial e comportamental. Desta maneira, o óleo-resina de *Copaifera reticulata* apresenta uma relativa margem de segurança para a utilização como agente terapêutico, embora outros estudos sejam necessários para o estabelecimento da sua eficácia terapêutica sem o acometimento de efeitos colaterais, principalmente após a exposição repetida a baixas doses.

Referências

Basile AC, Sertié JA, Freitas PCD, Zanini AC 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from *Brazilian copaifera. J Ethnopharmacol* 22: 101-109.

Brito MVH, Oliveira RVB, Morais MR, Lameira OA 1999. Efeito da copaíba no comportamento de ratos. *Rev Para Med* 13: 34-37.

Brito MVH, Oliveira RVB, Morais MR, Miranda JS, Reis JMC 2001. Análise gástrica após administração de copaíba: estudo experimental em ratos. *Gastroenterol Endosc Dig* 20:78-82.

Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B 2005. Topical antiinflamatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950.

Cavalini M, Folis GP, Resener MC, Alexandre RF, Zannin M, Simões CMO 2005. Serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Extensio: Revista Eletrônica de Extensão 2 (2) 1-11.

Costa DHM, Ferreira CAP, Silva JNM, Lopes J do CA, Carvalho IOP de. 1998. Potencial madeireiro de floresta densa no município de Mojú, Estado do Pará. Belém: Embrapa-CPATU. 33p (Embrapa – CPATY. Documentos, 121).

Fernandes RM, Pereira NA Paulo LG 1992. Anti-inflamatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). *Rev Bras Farm* 73: 53-56.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD 2007. Antinoceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol* 109: 486-492.

Hall CS 1934. Emotional behavior in the rat 1. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18: 385-403.

Handley SL, Mithani S 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327: 1-5.

Lima SRM, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 17: 1048-1053.

Moser VC, Tilson HA, Mcphail RC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, Kuling BM, Winneke G 1997a. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: II. Protocol design and testing procedures. *Neurotoxicol* 18: 929-938.

Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Franti´K E, Kulig BM, Mcphail RC, Tilson HA, Winneke G, Brightwell WS, Cagiano R, Gill MW, Haggerty GC, Hornychova M, Lammers J, Larsen JJ, Mcdaniel KL, Nelson BK, Ostergaard G 1997b. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: III. Results of proficiency studies. *Neurotoxicol* 18: 939-946.

Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Franti´K E, Kulig BM, Mcphail RC, Tilson HA, Winneke G, Brightwell WS, De Salvia MA, Gill Mw, Haggerty GC, Hornychova M, Lammers J, Larsen JJ, Mcdaniel KL, Nelson BK, Ostergaard G 1997c. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods: V. results of chemical testing. *Neurotoxicol* 18: 969-1056.

Motulsky H 1998. The InStat guide to choosing and interpreting statistical tests. GraphPad Software, Inc., San Diego California USA p: 1-126.

OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Guideline: 423. *Organization for economic co-operation and development (OECD), 2001.* Disponível em <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>. Acessada em março de 2008.

Oliveira ECP, Lameira AO, Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. *Rev Bras Pl Med* 8:14-23.

Prut L, Belzung C 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33.

Ribeiro FB, Mestriner ACD, Freitas O, Ramos MFS, Mestriner Junior W 2007. Estudo de Toxicidade Aguda da Oleoresina de copaíba e fração volátil. 15° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Ribeirão Preto/SP.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 277-281.

Souza Júnior OG, Garcia LG, Damous SH 2000. Colite induzida por ácido acético e tratada com enema de óleo-resina de copaíba. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 45: 131-135.

Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG, Hernández BV 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Plant Med* 68:808-812.

Valadares MC 2006. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50". *Rev Eletrôn Farm* 3:93-98.

Veiga Júnior VF, Pinto AC 2002. O gênero *Copaifera L*. *Quim Nova* 25: 273-286.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto Ac 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 Ethnopharm* 112: 248-254.

Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA 2005. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacog* 15: 361-372.

WHO. 2002. Traditional medicine strategy 2002-2005. World health organization Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf>. Acessado em setembro de 2008.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS MATERNOS DE RATOS EXPOSTOS AO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA *(C. RETICULATA)*

Introdução

A utilização de plantas medicinais é uma terapêutica milenar. As observações tradicionais sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das suas virtudes terapêuticas e pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitas vezes não terem seus constituintes químicos conhecidos bem como a avaliação da toxicidade.

A copaíba é uma das plantas com uso medicinal mais utilizada e conhecida no Brasil (Veiga Jr. et al., 2002). São árvores nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental, popularmente conhecida como copaibeiras ou pau d'óleo-resina. No Brasil, são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste. O gênero *Copaifera* L., pertence à família Fabaceae Lindl, sub família *Caesalpinioideae* Kunth (Veiga Jr. e Pinto, 2002). O óleo-resina utilizado nas preparações medicinais é um exsudado do tronco destas árvores e apresenta-se como um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. São constituídos principalmente por misturas de sesquiterpenos e de diterpenos (Veiga Jr. e Pinto, 2002.).

O uso do óleo-resina de copaíba tem sido indicado, entre outros, pela sua ação antiinflamatória (Carvalho et al., 2005; Veiga Jr. et al., 2007), antitumoral (Lima et al., 2003), antimicrobiana (Santos et al., 2008; Tincusi et al., 2002) e atividade antinociceptiva (Gomes et al., 2007). Embora haja estudos mostrando algumas das atividades terapêuticas do óleo-resina, não existem trabalhos que avaliem seu potencial tóxico nos órgãos maternos durante o período gestacional. Nesse período, os mecanismos metabólicos de alguns órgãos os tornam mais susceptíveis a lesões. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos histopatológicos da toxicidade do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) no fígado, rins e cérebro

de ratas Wistar durante o período gestacional.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado com 40 fêmeas Wistar, com idade entre 90 e 120 dias e peso de 251,1 ± 19,3 g (média±DP), provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília (UnB), estando aparentemente todos saudáveis. Anteriormente à administração do óleo-resina de copaíba, os animais foram aclimatados no biotério na Faculdade de Ciências da Saúde da UnB por um período de 15 dias. Os animais foram alocados individualmente em caixas de polipropileno, em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura (23 ± 2°C) e umidade relativa (70%). Os animais receberam água potável e ração comercial Purina®, Grupo Evialis, SP, Brasil, *ad libitum*. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (protocolo aprovado n.°77333/2007).

Para o acasalamento três ratas foram transferidas para a gaiola de um macho durante as três últimas horas do período escuro (6 às 9 horas da manhã). O cruzamento somente foi confirmado após verificação da presença de células corneificadas e espermatozóides no esfregaço vaginal, e esse foi considerado o dia zero de gestação.

Após a confirmação da prenhes, as fêmeas foram pesadas, alojadas em caixas individuais e distribuídas aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais cada: Controle; 500 mg/kg; 1000 mg/kg e 1250 mg/kg. O óleo-resina de copaíba foi diluído em solução Tween 80 à 2% e o volume final administrado foi fixado em 10 mL/kg peso corpóreo. Aos animais do grupo controle foi administrado 10 mL/kg de Tween 80 2%. O óleo-resina de copaíba foi administrado diariamente a partir do 6° dia de gestação, cobrindo o período de implantação do embrião, organogênese e o crescimento dos órgãos fetais (19° dia de gestação).

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata)* foi fornecido pela Embrapa Amazônia Oriental, sendo um *pool* de amostras extraídas de plantas do Campo Experimental do Mojú, PA, entre setembro de 2003 a agosto de 2004. O Campo se situa no km 30 da rodovia PA-150, entre as coordenadas geográficas de 2^{o} 08' 14'' à 2^{o} 12' 26'' de latitude sul e 48^{o} 47' 34'' à 48^{o} 14'' de longitude a oeste de Greenwich e

altitude de 16 m, possuindo uma área total aproximada de 1.095 ha (Costa et al., 1998). As plantas possuíam cerca de 20 m de altura, 260 cm de DAP (Diâmetro na Altura do Peito) e mais de 20 anos de idade. As concentrações de β cariofileno e β bisaboleno foram de 45,4 e 12,3 %, respectivamente (Oliveira et al., 2006).

Durante todo o tratamento, as fêmeas foram examinadas diariamente quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade, incluindo, mas não se limitando a: estresse; hipoatividade; respiração acelerada; irritação; tremores musculares; piloereção; cromodacriorréia; convulsões; respiração abdominal; salivação; lacrimejamento; diarréia; perda de pêlo e hemorragia vaginal. O peso corporal e o consumo de ração foram registrados a cada 3 dias.

No 20º dia de gestação, as fêmeas prenhes foram sacrificadas por inalação de CO_2. As cavidades abdominais foram abertas por incisão longitudinal e o fígado, rins direito e esquerdo e cérebro foram examinados macroscopicamente e posteriormente pesados. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formol 10% tamponado, diafinizados e submetidos a inclusão em parafina. Cortes de 5 µm de espessura obtidos em micrótomo (marca Leica, modelo RM2125 RT), foram corados pela Hematoxicilina-Eosina (HE) e avaliados em microscopia de luz.

Os dados de peso e ração foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, com nível de significância $p<0,05$.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os sinais clínicos de toxicidade observados nos animais durante o período do estudo, tanto no grupo controle quanto nos grupos expostos. Os sinais clínicos observados não apresentaram relação com a dose de copaíba administrada. A piloereção, diarréia e cromodacriorréia (Figura 1) foram provavelmente resultado do stress imposto aos animais durante a manipulação. Ribeiro et al. (2007) também não observou nenhum sinal clínico adverso em ratos machos e fêmeas expostos a dose única de óleo-resina de copaíba (espécie não determinada) (até 800 mg/kg). Por outro lado, a administração única, por meio de enema de 0,5 mL/kg do óleo-resina de copaíba, após colite induzida por ácido acético, ocasionou diarréia, piloereção e hemorragia nos animais tratados (Souza et al., 2000).

Tabela 1. Sinais clínicos de toxicidade observados durante o período gestacional em ratos Wistar expostas à copaíba

Sinais Clínicos	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Diarréia	3/10 (30%)	2/10 (20%)	4/10 (40%)	4/10 (40%)
Piloereção	0/10 (0%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	0/10 (0%)
Cromodacriorréia	2/10 (20%)	3/10 (30%)	2/10 (20%)	4/10 (40%)

(%) percentual de animais apresentando determinado sinal clínico de toxicidade.

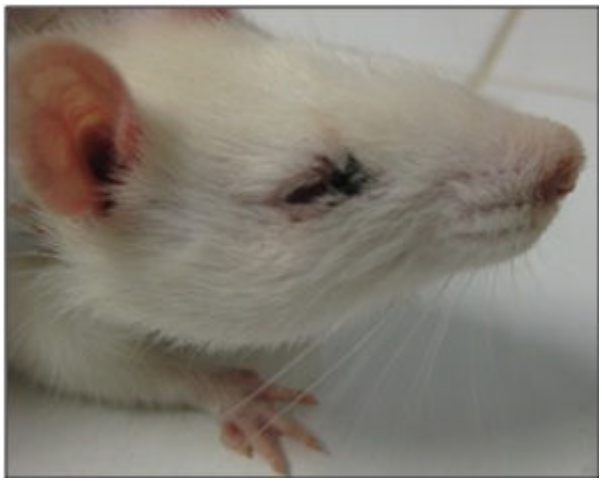


Figura 1: Rata apresentando cromodacriorréia no olho direito, verificado no 19° dia de gestação na dose de 500 mg/kg.

A evolução do peso materno está mostrada na Tabela 2. Diminuições significativas no peso corpóreo materno foram observadas nos grupos 1000 mg/kg e 1250 mg/kg p.c. em relação ao grupo controle ao longo do período gestacional (DG20-DG6 e DG20-DG0). Quando se considerou o peso corrigido materno DPeso=[(Peso Final – Peso Inicial) – Peso do Útero] também foram observadas diferenças significativas entre as maiores doses do óleo-resina de copaíba. Na dose de 500 mg/kg não se verificou qualquer alteração relacionada ao ganho de peso.

Tabela 2. Dados de peso materno de ratas Wistar expostas ao óleo-resina de copaíba do 6º ao 19º dia de gestação

Tratamento	Grupo controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
DG 0	250,5 ± 18,1	255,8 ± 18,3	260,0 ± 16,2	238,1 ± 19,6
DG 20	361,8 ± 17,0	367,0 ± 21,9	343,3 ± 31,0	329,2 ± 27,8
DG 6 – DG 0	18,7 ± 8,7	24,8 ± 10,7	21,2 ± 9,7	25,5 ± 6,47
DG 20 – DG 6	92,6 ± 14,1	86,4 ± 14,9	62,1 ± 23,7*	65,6 ± 19,3*
DG 20 – DG 0	111,3 ± 13,0	111,2 ± 23,0	83,3 ± 31,3*	91,1 ± 16,8*
DPeso	45,9 ± 10,9	38,5 ± 19,6	26,9 ± 25,9*	29,0 ± 16,2*

DG0: 1° dia de gestação; DG20: 20° dia de gestação; DG 6: 6° dia de gestação; DPeso=[(Peso Final – Peso Inicial) – Peso do Útero]. Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. *Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle foram encontradas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney (p≤0,05).

Verificou-se uma diminuição significativa no consumo de ração a partir do dia 9° de gestação no grupo de maior dosagem (Figura 2).

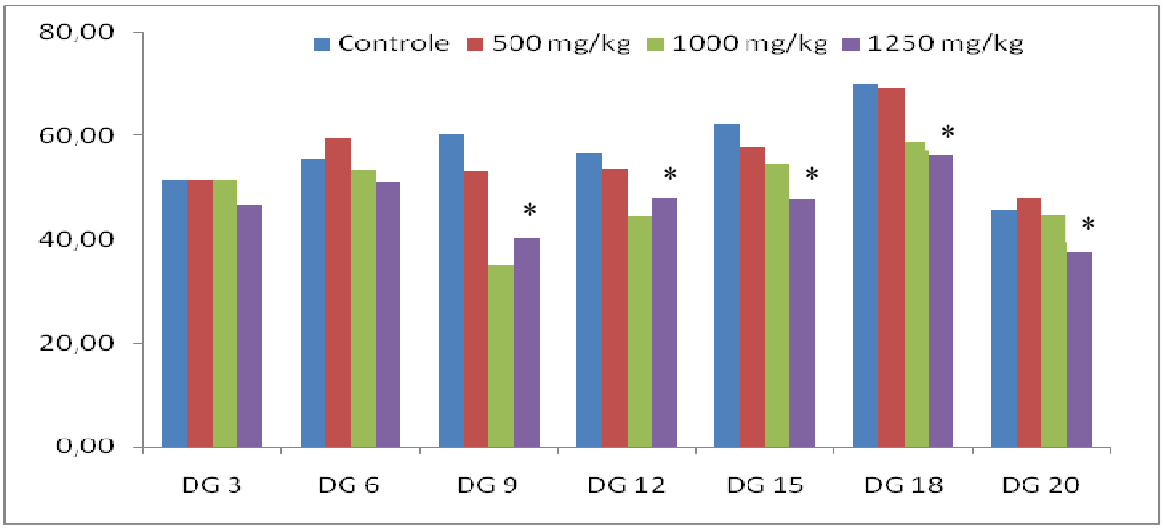


Figura 2. Mediana do consumo de ração de ratas Wistar expostas a copaíba do 6º ao 19º dia de gestação (DG). *Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle foram encontradas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney (p≤0,05).

Gomes et al., (2007) não encontraram qualquer alteração no consumo de água ou ração por camundongos durante cinco dias após a dosagem via oral única com 500 mg/kg (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). Por outro lado, Souza. et al. (2002) verificaram nos dois primeiros dias um menor consumo de ração bem como maior perda ponderal até o 4º dia do experimento, após infusão de 0,5 mL/kg de *C. multijuga Hayne* na cavidade peritoneal de ratos,

esclarecendo ser possivelmente pela toxicidade do óleo-resina de copaíba absorvido pela superfície peritoneal. Um estudo em ratos com *Elephantorrhiza elephantina*, também da família Fabaceae., foi realizado para determinar a toxicidade desta planta. Machos e fêmeas foram divididos em quatro grupos consistindo de cinco ratos cada e administrou-se doses de 200-1600mg/kg p.c., 200-800mg/kg p.c. e 50-400mg/kg p.c. para toxicidade aguda (1 dia), sub-aguda (14 dias) e crônica (35 dias), respectivamente. Não foram observadas mortes nos grupos, nem alterações no consumo de água e ração (Maphosa et al., 2010).

A média do peso relativo (% peso relativo dos órgãos = peso absoluto do órgão/ peso materno x 100) do fígado, rim e cérebro são apresentadas na Figura 3. Diferenças significativas foram encontradas no peso do fígado dos animais tratados (500mg/kg, 1000mg/kg e 1250mg/kg) em relação ao grupo controle. Paumgartten et al., (1998) investigou os efeitos da administração oral do monoterpeno β-myrcene nas doses de 0, 100, 300 and 500 mg/kg em ratos. Metade das fêmeas do estudo recebeu o monoterpeno 21 dias anterior ao acasalamento, durante o acasalamento e gestação e no 21° foi realizada a cesárea. Não foram observados sinais de toxicidade materna durante o estudo, entretanto um pequeno aumento no peso do fígado e dos rins foi verificado. Essa alteração foi explicada pelo fato do β-mirceno ser um provável indutor da monooxigenase hepática e o aumento do fígado ser um resultado da acentuada hipertrofia do retículo endoplasmático, devido a uma indução da síntese de enzimas microssomais nos animais tratados.

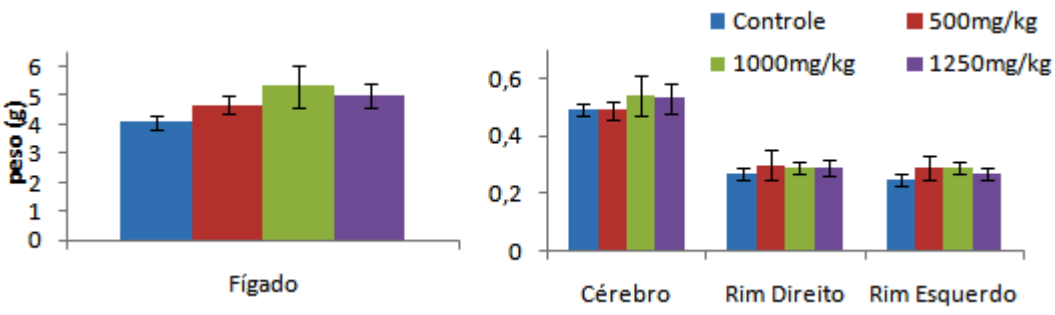


Figura 3. Média do peso relativo (%) dos órgãos fígado, rim e cérebro de ratas Wistar expostos ao óleo-resina de copaíba do 6º ao 19º dia de gestação.

Não foram verificadas alterações macroscópicas nos órgãos (fígado, rins e cérebro) das ratas. Já a análise histológica dos órgãos revelou alguns achados microscópicos no fígado como demonstrados na Tabela 3, entretanto os resultados não foram estatisticamente diferentes entre o grupo controle e os grupos expostos a copaíba. Essa análise é importante já que várias doenças hepáticas podem ocorrer durante a gravidez, trazendo sérias conseqüências para a mãe e o feto. A alteração morfológica no fígado encontrada em todos os grupos foi uma discreta degeneração hidrópica (Figura 4) caracterizada pelo acúmulo de água no citoplasma, que se tornou mais volumoso e pálido com núcleos normalmente posicionados. Esse achado não é evidência de toxicidade para o fígado, visto que se a copaíba fosse realmente tóxica a degeneração seria mais intensa e, além disso, apoptose e necrose de hepatócitos seriam evidenciadas.

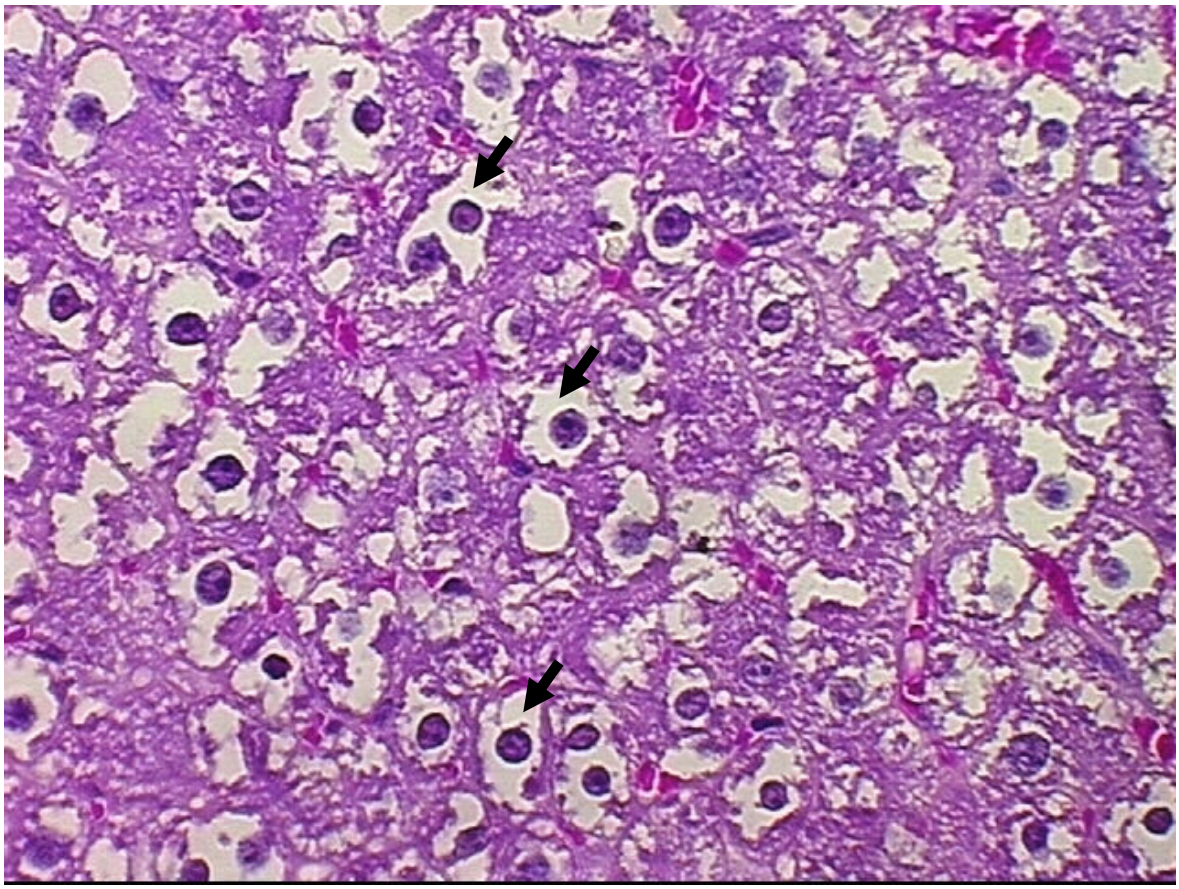


Figura 4: Discreta degeneração hidrópica (setas) no fígado do rim de um animal exposto a 1000mg/kg do óleo-resina de copaíba. (HE, 100X).

Nos grupos expostos a 1000 mg/kg e 1250 mg/kg verificou-se uma discreta esteatose (Figura 5) em 1 e 2 animais, respectivamente, caracterizado por acúmulo de lipídios histologicamente visíveis no citoplasma dos hepatócitos. Todas as alterações histopatológicas verificadas nos órgãos foram muito discretas. Brito et al. (2000), estudaram os efeitos microscópicos do óleo-resina de copaíba no fígado de ratos machos. Os animais expostos a copaíba receberam doses de 0,63 mL/kg p.c. administradas via oral por 14 dias, e os resultados obtidos não demonstraram alterações hepatocelulares, porém, foi verificada congestão vascular nas veias portais e centrolobulares.

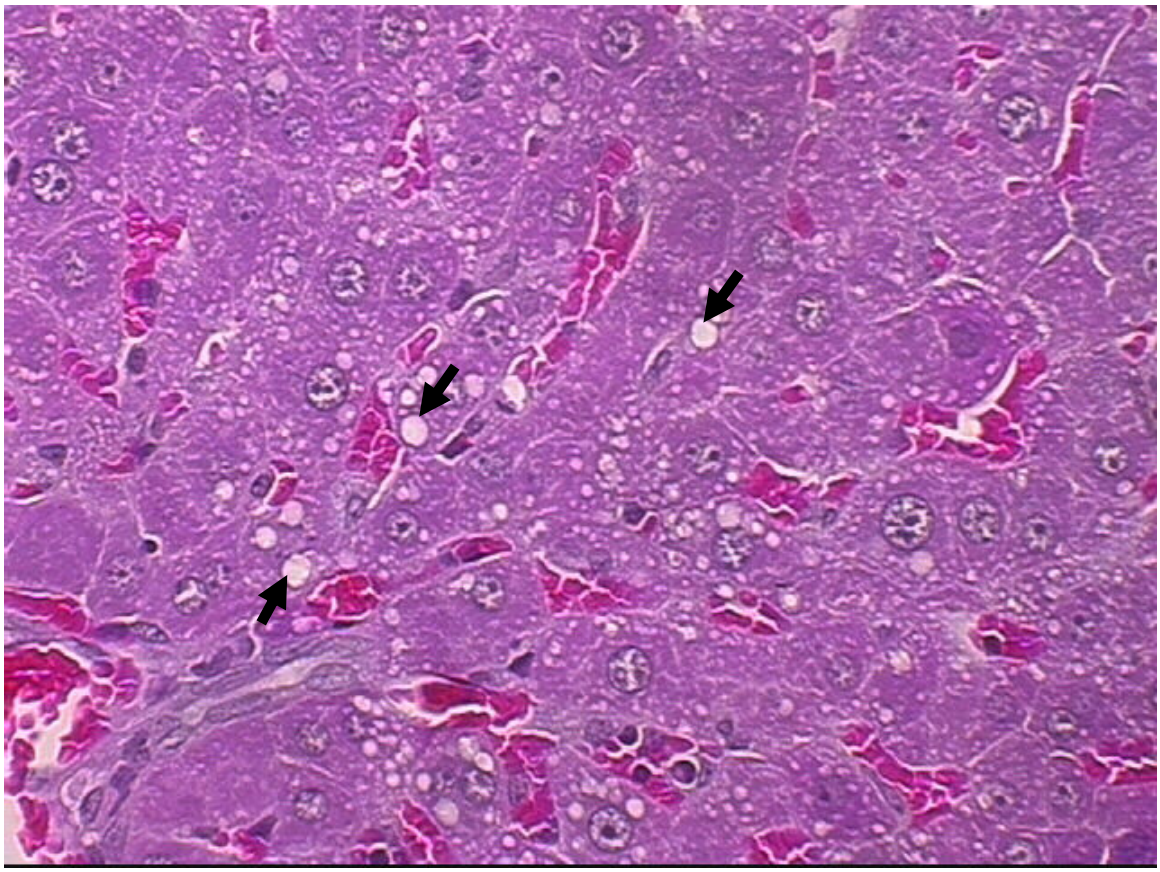


Figura 5. Discreta esteatose (setas) no fígado de rato exposto a 1250 mg/kg de copaíba. (HE, 100X).

No presente trabalho não foram encontrados qualquer alteração significativa no rim dos animais expostos a copaíba. Brito et al. (2005) avaliaram o efeito do óleo-resina de copaíba (0,63 mL/kg via oral de *C. multijuga* Hayne*)* nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratas Wistar (n=18) submetidas à síndrome de isquemia e reperfusão renal. Observou-se que o óleo-resina de copaíba diminuiu os níveis

séricos de uréia em 24 horas e 48 horas e os de creatinina nas 48 horas após o procedimento de isquemia. Tais achados demonstraram que a administração prévia, por sete dias, à isquemia e reperfusão, do óleo-resina de copaíba por gavagem, protegeu a função renal dos animais nas 48 horas após a isquemia e reperfusão.

Tabela 3. Análise histopatológica dos órgãos fígado e rins de ratas expostos a copaíba do 6° ao 19° dia de gestação. Resultados expressos em % de animais com alteração (n=10)

		Copaíba (mg/kg p.c.)		
Tratamento	**Grupo Controle**	**500**	**1000**	**1250**
Fígado				
Degeneração Hidrópica	90%	90%	80%	80%
Esteatose	0%	0%	10%	20%
Rim				
Infiltrado de mononucleares	10%	20%	0%	0%

Conclusão

Poucos trabalhos estão disponíveis em relação a toxicidade ao óleo-resina de copaíba e nem todos trazem as informações necessárias, o que gera resultados inconsistentes e controversos, principalmente pela biodiversidade entre as espécies dessa planta. O presente estudo visou contribuir com informações acerca do uso do óleo-resina da *Copaifera reticulata* durante o período gestacional. Os resultados demonstram toxicidade materna em altas doses (1000 mg/kg e 1250mg/kg), evidenciada pela diminuição no ganho de peso corpóreo e diminuição no consumo de ração. Entretanto, não foi encontrada qualquer alteração histopatológica significativa no fígado, rim e cérebro dos animais expostos a copaíba, sugerindo uma segurança relativa do óleo-resina quando utilizado durante a gestação. Estudos adicionais devem ser realizados a fim de avaliar mais dados a respeito da ingestão do óleo-resina, visando também a interação materno-fetal.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Osmar Alves Lameira da Embrapa Oriental por fornecer o óleo-resina de copaíba.

Referências

Brito MVH, Oliveira RVB, Silveira EL, Reis JMC, Noguchi A, Epaminondas WA,

Moraes MR 2000. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. *Acta Cir Bras* 15: 2.

Brito VHB, Moreira RJ, Tavares MLC, Carballo MCS, Carneiro TX, Santos AAS 2005. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir Bras* 20: 243-246.

Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B 2005. Topical antiinflamatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950.

Costa DH, Ferreira CAP, Silva JNM, Lopes J do CA 1998. Potencial madeireiro de floresta densa no município de Mojú, Estado do Pará. Belém: Embrapa-CPATU. 33p (Embrapa – CPATY. Documentos, 121).

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol* 109: 486-492.

Lima SRM, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 17:1048-1053.

Maphosa V, Masika PJ, Moyo B 2010. Toxicity evaluation of the aqueous extract of the rhizome of *Elephantorrhiza elephantina* (Burch.) Skeels. (Fabaceae), in rats. *Food Chem Toxicol* (48):196-201.

Oliveira ECP, Lameira AO, Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. *Rev Bras Plant Medic* 8: 14-23.

Paumgartten FJ, De-Carvalho RR, Souza CA, Madi K, Chahoud I 1998. Study of the effects of beta-myrcene on rat fertility and general reproductive performance. *Braz J Med Biol Res* 31: 955-65.

Ribeiro FB, Mestriner ACD, Freitas O, Ramos MFS, Mestriner Junior W 2007. Estudo de Toxicidade Aguda do Oleoresina de copaíba e fração volátil. In: 15° da Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Ribeirão Preto/SP. *Anais do 15°*

Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo: [s.n.] p. 1. (Resumo).

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 277-281.

Souza Júnior OG, Garcia L, Damous SH 2000. Colite induzida por ácido acético e tratada com enema de óleo-resina de copaíba. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 45: 131-135.

Souza Júnior OG, Guimarães Neto HP, Pinto NT, Santos MT, Carvalho RA 2002. Achados macroscópicos na cavidade peritoneal de ratos, após aplicação do óleo de copaíba. *Rev Par Med* 16: 14-18.

Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG Hernández BV 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Plant Med* 68: 808-812.

Veiga Júnior VF, Pinto AC 2002. O gênero *Copaifera L*. *Quim Nova* 25: 273-286.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 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 Ethnophar.* 112: 248-254.

CAPÍTULO III

EMBRIOFETOTOXICIDADE DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA *(C. RETICULATA*) EM RATOS

Introdução

Conhecida popularmente como copaíba, o gênero *Copaifera* L. pertence à família Fabaceae Lindl., sub família *Caesalpinioideae* Kunth (Veiga Jr. e Pinto, 2002) e é uma das plantas com uso medicinal mais utilizada e conhecida no Brasil. O uso tradicional levou a uma intensa comercialização da copaíba como óleo-resina ou em cápsulas do óleo-resina *in nature*, e vem sendo exportado do Brasil principalmente para França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos (Veiga Jr. e Pinto, 2002). O óleo-resina é constituído principalmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos (Veiga Jr. e Pinto, 2002.) e várias de suas propriedades terapêuticas vêm sendo estudadas, incluindo sua ação antiinflamatória (Carvalho et al., 2005; Veiga Júnior et al., 2007), antitumoral (Lima et al., 2003), antimicrobiana (Tincusi et al., 2002), antinociceptiva (Gomes et al., 2007), antioxidante (de Lima Silva et al., 2009), e antiparasitária (Santos et al., 2008).

Em mamíferos, a função materna normal é indispensável para o desenvolvimento adequado dos fetos e para a saúde da prole, e a exposição a xenobióticos durante a gestação pode causar efeitos adversos no desenvolvimento fetal (Chahoud, 1999). Apesar da extensa utilização do óleo-resina de copaíba pelas suas propriedades farmacológicas, poucos estudos mostram o potencial tóxico do produto e não há dados da toxicidade do desenvolvimento que comprovem a segurança da utilização desta planta por gestantes. Cunha et al. (2003) reportaram propriedades de relaxamento uterino do diterpeno ácido caurenóico da *Copaifera langsdorffii* em ratos, causados principalmente através do bloqueio de cálcio e em parte, pela abertura dos canais de potássio ATP-sensíveis.

O presente estudo foi realizado para investigar o potencial efeito tóxico do óleo-resina de copaíba no desenvolvimento embriofetal em ratos Wistar.

Materias e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com o ”OECD's Guideline for the Testing of Chemicals – n° 414: “Prenatal Developmental Toxicity Study” (Adopted: 22nd January 2001).

Animais

O experimento foi realizado com ratos machos e fêmeas nulíparas Wistar, com idade entre 90 e 120 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília (UnB). Anteriormente ao início do experimento, os animais foram aclimatados no biotério na Faculdade de Ciências da Saúde da UnB por um período de 15 dias. Os animais foram alocados individualmente em caixas de polipropileno e cama de maravalha de pinho branco esterelizada em autoclave e em condições de ambiente controladas (luminosidade de 12h/12h, claro/escuro; temperatura de 23 ± 2°C e umidade relativa de 70%). Os animais receberam *ad libitum* água potável e ração comercial (Labina: Proteína bruta 23%; Extrato etéreo 4%; Matéria fibrosa 5%; Matéria mineral 10%; Cálcio 1,3%; Fósforo 0,85%) registrada no Ministério da Agricultura SP-0311730758 e fornecida pela Purina® Grupo Evialis, Paulinia/SP/Brasil. O manejo e cuidados com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (protocolo aprovado n.°77333/2007).

Para o acasalamento, três fêmeas foram transferidas para a caixa de um macho durante as três últimas horas do período escuro (6 às 9 horas da manhã). O dia em que as fêmeas apresentaram espermatozóides e células corneificadas no esfregaço vaginal foi designado como dia 0 de gestação.

Tratamento

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata)* foi fornecido pela Embrapa Amazônia Oriental, sendo um *pool* de amostras extraídas de plantas do Campo Experimental do Mojú, PA, entre setembro de 2003 a agosto de 2004. O Campo se situa no km 30 da rodovia PA-150, entre as coordenadas geográficas de 2° 08' 14" à 2° 12' 26" de latitude sul e 48° 47' 34" à 48° 14" de longitude a oeste de Greenwich e altitude de 16 m, possuindo uma área total aproximada de 1.095 ha (Costa et al.,

1998). As plantas possuíam cerca de 20m de altura, 260 cm de DAP (Diâmetro na Altura do Peito) e mais de 20 anos de idade. As concentrações de β-cariofileno e β-bisaboleno foram de 45,4 e 12,3 %, respectivamente (Oliveira et al., 2006).

O extrato-bruto do óleo-resina de copaíba foi diluído diariamente em Tween 80 2% e administrado por via oral (gavagem gástrica) do 6º ao 19º dia de gestação nas seguintes concentrações: 500mg/kg, 1000mg/kg e 1250mg/kg (25 animais por grupo), conforme definido no teste piloto descrito posteriormente. O volume final administrado foi 10 mL/kg p.c. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Tween 80 2%).

Durante todo o tratamento, as fêmeas foram examinadas diariamente quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade materna. Qualquer variação foi devidamente registrada e o animal foi rigorosamente acompanhado. O peso corporal e o consumo de ração foram registrados a cada 3 dias.

Cesárea

No 20º dia de gestação, as fêmeas foram sacrificadas por inalação de CO_2. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal, o útero foi pesado com todo seu conteúdo e os órgãos foram examinados macroscopicamente. O número de fetos vivos e mortos, reabsorções e os corpos lúteos foram registrados. O número de sítios de implantação foi determinado pelo método de Salewski (1964), que consiste na imersão do útero (sem os fetos) em solução de sulfeto de amômio a 10% durante 10 minutos; em seguida, o útero é lavado em água corrente e mergulhado por 10 minutos em solução formada por partes iguais de ferrocioneto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1%. Os sítios de implantação que aparecem escuros na parede uterina são localizados e contados. Todos os fetos vivos e suas respectivas placentas foram imediatamente pesados e examinados quanto a presença de anomalias externamente visíveis. Metade de cada ninhada, escolhidos aleatoriamente, foi fixada em solução de Bodian (5% de ácido acético glacial, 2% de formaldeído 37%, 72% de etanol 95%, 21% de água destilada) e avaliado para anomalias viscerais usando a técnica de microdissecção descrita em Miranda et al. (2006). Os órgãos dos fetos: coração, timo, pulmão, baço, rins e pulmões também foram pesados. A outra metade da ninhada foi fixada em 5% solução formol, macerados em hidróxido de potássio, clarificados com solução de glicerina/etanol/álcool benzílico e corados com Alizarina Red S para avaliação do

esqueleto (Dawson, 1926).

Teste Piloto

Para definição das dosagens do óleo-resina de copaíba utilizadas no presente estudo realizou-se inicialmente um estudo de toxicidade aguda seguindo o OECD's Guideline for the Testing of Chemicals – n° 423: “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” (orientações atualizadas, adotadas em 17 de dezembro de 2001). A dose letal aguda foi estimada como maior que 2000 mg/kg pc (Sachetti et al., 2009).

Realizou-se um estudo piloto para determinar as dosagens para a realização do estudo de toxicidade no desenvolvimento pré-natal, seguindo o “Pilot Study for Prenatal Developmental Toxicity in Rats (OECD 414). Para a realização do piloto foram utilizados 4 grupos (N = 5 animais/grupo): Controle (Tween 80, 2%), 500, 1000, 1500mg/kg de peso corporal, diluída em Tween 80 2%. O volume administrado de 10 mL/kg p.c. para todos os grupos.

Análise estatística

Os dados reprodutivos, bem como peso materno e consumo de ração foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis seguido de Mann–Whitney. As alterações esqueléticas e viscerais foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, todos com nível de significância de $p<0,05$.

Resultados

Teste piloto

Devido a inconsistência de dados encontrados em estudos já realizados no que tange a dosagem da copaíba, além da diversidade entre espécies, bem como a variabilidade das espécies animais (roedores e não roedores), foi necessário realizar um teste piloto para estabelecer as doses a serem empregadas no experimento. As diretrizes preconizam que o limite superior do intervalo de doses seja suficientemente alto para produzir alguma toxicidade materna (não mais que 10% de mortalidade) ou toxicidade para o embrião, e o limite inferior deste intervalo seja uma dose próxima da dose terapêutica e que não cause efeitos embriotóxicos (OECD n°. 414, 2001). No teste piloto, 3 animais morreram no grupo que recebeu a dosagem de 1500mg/kg p.c. do óleo-resina de copaíba, no 14°, 14° e 18° dia de gestação, sendo necessário

repetir o estudo com uma dosagem intermediária de 1250mg/kg. Nessa dose os animais apresentaram alguma toxicidade mas não mortalidade (dados não mostrados). Desta forma, o grupo de maior dose foi definido em 1250mg/kg .

Toxicidade Materna

O percentual de fêmeas prenhes/tratadas é apresentado na Tabela 1, apresentando semelhança entre os grupos quanto ao número de animais. Todos os animais sobreviveram, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao óleo-resina de copaíba e nenhuma alteração comportamental durante o estudo foi evidenciada. Os sinais clínicos de toxicidade materna encontrados nos animais estão mostrados na Tabela 1, não se observando qualquer diferença entre o grupo controle e expostos a copaíba. A avaliação dos órgãos maternos durante a cesárea não apresentou nenhuma alteração patológica externamente visível nos animais controle e expostos a copaíba.

Houve uma diminuição significativa no consumo de ração pelos animais a partir do 9° dia de gestação nos grupos 1000mg/kg e 1250mg/kg em relação ao grupo controle (Figura 1). Esta diminuição induziu uma perda significativa no ganho de peso corpóreo durante a gravidez (DG20 – DG0) e no período de tratamento (DG20-DG6) nas duas maiores doses. Não foram observadas diferenças significativas no peso do útero gravídico entre os grupos. Uma redução estatisticamente significativa no ganho de peso [(Peso Final menos Peso Inicial) menos Peso do Útero] foi observada nas doses de 1000mg/kg e 1250mg/kg.

Verificou-se um aumento no peso relativo (peso do órgão em relação ao peso corpóreo) do fígado em todos os grupos expostos ao óleo-resina de copaíba (Tabela 1). Houve também um aumento no peso relativo dos rins direito e esquerdo nas doses de 500mg/kg e 1000mg/kg. O cérebro também apresentou um aumento no peso relativo nos grupos 1000mg/kg e 1250mg/kg.

Tabela 1. Resultados das avaliações maternas do grupo controle e expostas a copaíba do 6° ao 19° dia de gestação

TRATAMENTO	**Grupo Controle**	**Copaíba (m/kg p.c.)**		
		500	**1000**	**1250**
Fêmeas Tratadas	25	25	25	25
Fêmeas Prenhes	22	23	22	24
% Fêmeas Prenhes/Tratadas	88	92	88	96
Sinais Clínicos de Toxicidade[b]				
Cromodacriorréia	3	5	3	7
Hemorragia Vaginal	0	0	1	0
Diarréia	7	7	9	10
Piloereção	0	0	3	1
Peso Materno (g)				
Dia 0	250,7±21,9	257,9±15,6	254,7±18,6	237,8±20,0
Dia 20	362,6±20,2	375,3±22,6	333,3±31,8**	327,0±31,4**
Ganho Peso Materno (g)				
Dia 6 - Dia 0	20,9±9,2	22,7±8,4	22,6±8,2	23,6±6,2
Dia 20 - Dia 0	91,0±12,3	94,7±19,4	56,0±26,2**	65,5±20,6**
Dia 20 - Dia 6	111,9±15,1	117,4±21,6	78,6±30,6**	89,1±19,8**
Peso Útero Gravídico (g)	67,1±9,7	75,8±11,8	60,5±12,3	60,4±12,6
D Peso[a]	44,7±13,4	40,7±17,4	19,6±24,9**	28,7±15,7**
Peso Relativo dos órgãos (%)				
Fígado	4,03±0,29	4,64±0,33**	5,21±0,60**	5,19±0,45**
Cérebro	0,49±0,03	0,47±0,04	0,55±0,06**	0,54±0,05**
Rim Direito	0,27±0,02	0,29±0,05*	0,30±0,02*	0,29±0,03
Rim Esquerdo	0,25±0,02	0,27±0,03*	0,29±0,03**	0,27±0,02

[a]D Peso=[(Peso Final – Peso Inicial) – Peso do Útero];

[b] Número de fêmeas apresentando algum sinal clínico de toxicidade ao menos uma vez durante o tratamento. Os dados foram apresentados como Média ± Desvio Padrão. O ganho de peso materno foi analisado pelo teste Kruskal-Wallis seguido de Mann- Whitney Utest. Os outros parâmetros foram analisados por ANOVA e Dunnett t (2-sided)[a]

*significativamente diferente em relação ao Grupo Controle p<0,05

**significativamente diferente em relação ao Grupo Controle p<0,01

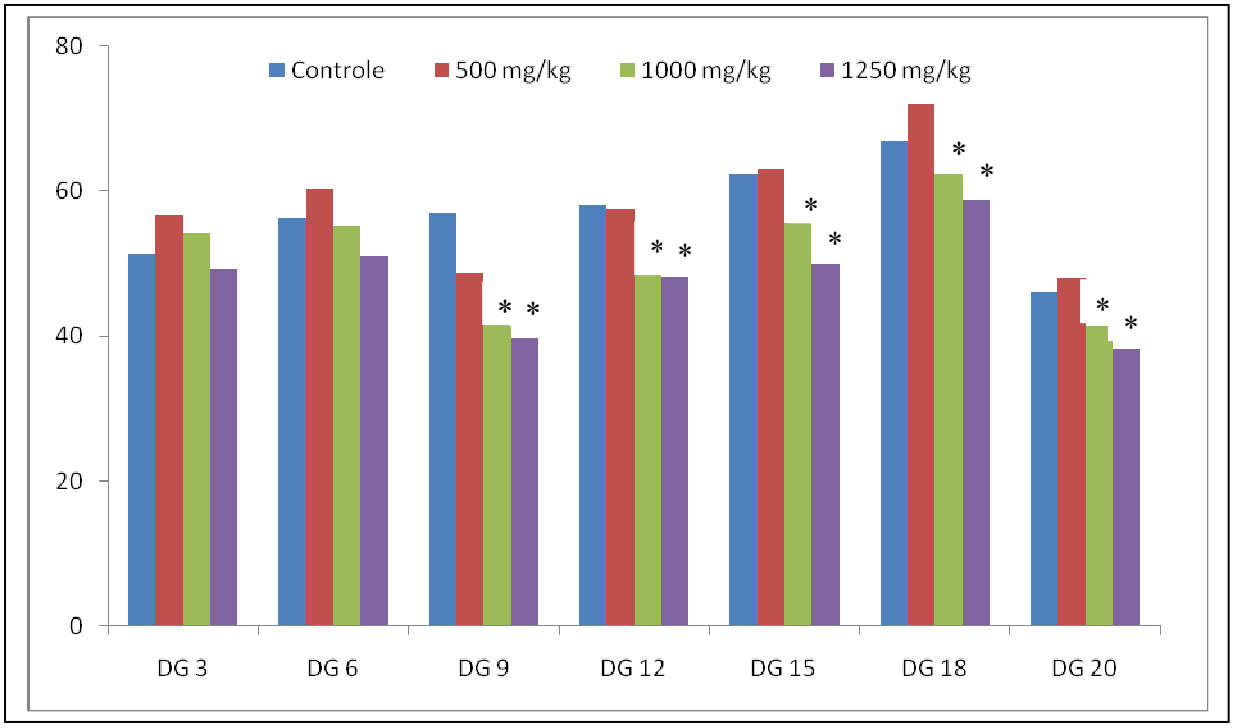


Figura 1. Mediana do consumo de ração das fêmeas expostas ao óleo-resina de copaíba do 6° ao 19° dia de gestação. DG: Dia de gestação. Os valores foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido de Mann- Whitney Utest. *significativamente diferente em relação ao Grupo Controle $p<0,05$

Embriofetotoxicidade

A Tabela 2 mostra os parâmetros de toxicidade reprodutiva e embriotoxicidade avaliados no estudo. A média do número de corpos lúteos e os sítios de implantação por fêmea para todos os grupos expostos a copaíba não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Também não houve diferença no número de reabsorções entre grupo controle e expostos ao óleo-resina. Não houve redução no número de fetos vivos (Figura 2) das fêmeas tratadas e a média do peso da placenta por ninhada apresentou valores semelhantes entre todos os grupos. Entretanto, a média do peso corpóreo fetal por ninhada foi reduzida nos grupos tratados com 1000mg/kg e 1250mg/kg, sugerindo-se um retardo no crescimento fetal nas maiores doses. A razão entre o número de fetos fêmeas e machos (Tabela 2) dos grupos tratados foi similar àquela do grupo controle, indicando que ambos os sexos respondem com igual susceptibilidade à exposição pré-natal ao copaíba.

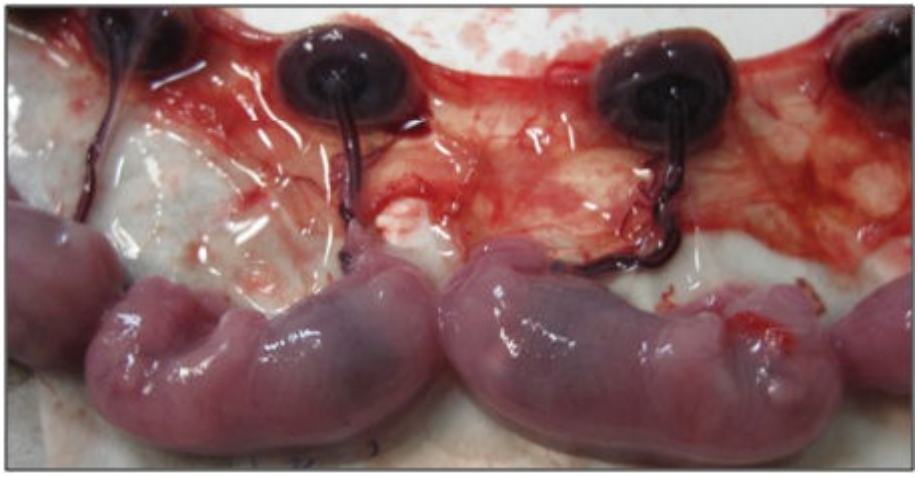


Figura 2: Fetos vivos após realização da cesárea no 19° dia de gestação.

Tabela 2. Embriofetotoxicidade das fêmeas expostas oralmente ao óleo-resina de copaíba do 6° ao 19° dia de gestação

		Copaíba (mg/kg p.c.)		
TRATAMENTO	**Grupo Controle**	**500**	**1000**	**1250**
Corpos Lúteos (média±SD)	14,14±1,25	15,41±1,74	14,48±1,69	14,43±1,83
Sítios de Implantação				
Total (N)	282	308	268	286
N por Ninhada (média±SD)	12,82±1,53	13,95±1,70	12,76±2,34	12,43±3,06
Reabsorções				
Total (N)	16	7	16	20
N por Ninhada (média±SD)	0,73±0,98	0,32±0,78	0,71±0,84	0,78±0,99
Precoce (N)	16	7	15	19
Tardia (N)	0	0	1	1
Fetos Mortos (N)	0	1	0	0
Fetos Vivos				
Total (N)	266	300	252	266
N por Ninhada (média±SD)	12,09±1,74	13,64±1,67	12,00±2,41	11,56±2,73
Peso Corpóreo Fetal (g)				
Por Ninhada (média±SD)	3,75±0,25	3,78±0,47	3,35±0,5*	3,48±0,34*
Peso Placenta (g)				
Por Ninhada (média±SD)	0,49±0,03	0,49±0,04	0,47±0,06	0,48±0,06
Fêmeas/Machos	136/130	156/144	134/118	137/129
Razão	1,05	1,08	1,13	1,06

N (número) foram comparados pelo teste Chi-Square. Os dados apresentados como média ± Desvio Padrão foram analisado pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett t (2-sided)[a]. (*) significativamente diferente em relação ao Grupo Controle p<0,05. Reabsorções foram classificadas como: Precoce, sítios de implantação detectados aonde não há nenhum feto ou feto/placenta remanescente; Tardia, é possível a discriminação entre os resíduos do feto e placenta.

Ao se considerar a média do peso relativo dos órgãos fetais, por ninhada (Tabela 3) não se constatou qualquer alteração estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos.

Tabela 3. Média do peso relativo (%) dos órgãos dos fetos expostos *in utero* ao óleo-resina de copaíba (500, 1000 e 1250 mg/kg) do 6° ao 19° dia de gestação

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Peso Fetal (g)	3,9192±0,3648	3,9342±0,5178	3,5160±0,5515	3,5417±0,3748
Rim Direito (%)	0,2530±0,0250	0,2543±0,0231	0,2529±0,0243	0,2460±0,0224
Rim Esquerdo (%)	0,2394±0,0202	0,2411±0,0305	0,2408±0,0238	0,2308±0,0236
Fígado (%)	8,8409±0,7056	8,6787±1,0281	8,6614±0,8984	8,6347±1,1248
Baço (%)	0,1123±0,0171	0,1229±0,0250	0,1120±0,0205	0,1143±0,0175
Timo (%)	0,1212±0,0149	0,1218±0,0276	0,1112±0,0219	0,1089±0,0145
Coração (%)	0,4751±0,0528	0,4942±0,0473	0,4641±0,0549	0,4658±0,0540
Pulmão (%)	2,3062±0,2274	2,3724±0,2098	2,4146±0,2217	2,3378±0,2641

Os valores são média ± desvio padrão. (%) Peso Relativo dos órgãos (peso absoluto do órgão (x 100)/ peso fetal). Para a análise dos pesos relativos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p<0,05$. Em toda a análise utilizou-se a ninhada como unidade de medida. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos órgãos quando considerado grupo controle em relação aos expostos ao óleo-resina de copaíba.

Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e os fetos expostos a copaíba quanto a frequência de anormalidades externamente visíveis (Tabela 4). Entretanto, as avaliações viscerais demonstraram diferença significativa, mas não dose dependente, na dilatação do ureter direito e esquerdo nas doses de 500 e 1250mg/kg (Figura 3 e 4). Uma significativa diferença também foi encontrada no ureter direito que apresentou-se tortuoso na dose de 500mg/kg do óleo-resina de copaíba (Tabela 4).

Tabela 4. Ocorrência de anormalidades externamente visíveis e viscerais dos fetos expostos *in utero* ao óleo-resina de copaíba durante a gestação

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	**1000**	**1250**
Anormalidades externamente visíveis				
Fetos analisados (N)	266	300	252	266
Ninhadas analisadas (N)	22	22	21	23
Hematomas				
Fetos (%)	0,75	0	0,40	0,75
Ninhadas (%)	9,09	0	4,76	8,69
Atresia anal				
Fetos (%)	0,37	0	0	0
Ninhadas (%)	4,54	0	0	0
Cauda curta				
Fetos (%)	0	0	0,40	0
Ninhadas (%)	0	0	4,76	0
Pata Traseira torta				
Fetos (%)	0	0	0,40	0
Ninhadas (%)	0	0	4,76	0
Anomalias Viscerais				
Fetos analisados (N)	128	141	115	121
Ninhadas analisadas (N)	21	21	20	21
Rim Esquerdo (Posição Irregular)				
Fetos (%)	0	0	2,61	1,65
Ninhadas (%)	0	0	15	9,52
Ventrículo cerebral (dilatado)				
Fetos (%)	0,78	0	0	0
Ninhadas (%)	4,76	0	0	0
Fígado (Lóbulo Extra)				
Fetos (%)	6,25	3,55	6,96	8,26
Ninhadas (%)	23,8	19,0	35,0	28,6
Testículo (Posição Irregular)				
Fetos (%)	1,56	2,13	3,48	2,48
Ninhadas (%)	9,52	14,3	15,0	14,3
Ureter Esquerdo (Dilatado)				
Fetos (%)	0	2,84*	0,87	3,30*
Ninhadas (%)	0	14,28	5,0	14,28
Ureter Esquerdo (Tortuoso)				
Fetos (%)	0	2,13	0,87	2,48
Ninhadas (%)	0	14,28	5,0	9,52

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Ureter Direito (Dilatado)				
Fetos (%)	0	5,67*	0,87	4,13*
Ninhadas (%)	0	23,8*	5,0	19,04*
Ureter Direito (Tortuoso)				
Fetos (%)	0	4,96*	0,87	1,65
Ninhadas (%)	0	19,04*	5,0	4,76

Número (N). As proporções foram analisadas pelo Teste Chi-Square. * Diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.

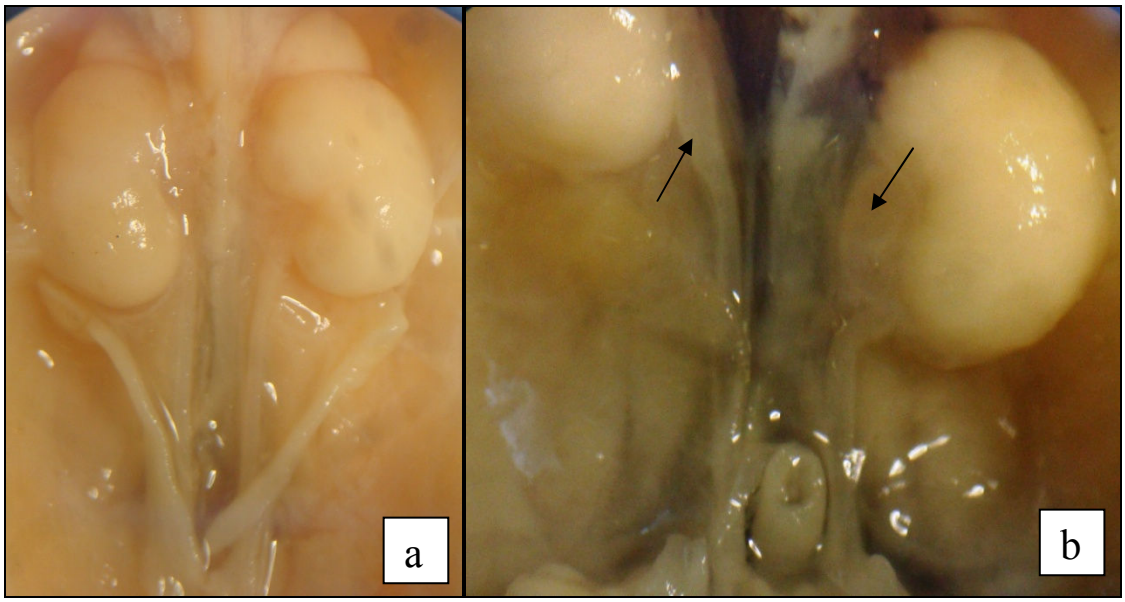


Figura 3. a) Morfologia normal de rins e ureter; b) Ureter direito e esquerdo dilatados próximo a pelve renal (setas) de fetos expostos *in utero* a 500mg/kg do óleo-resina de copaíba do 6° ao 19° dia de gestação.

A ocorrência de anormalidades no esqueleto dos fetos expostos a copaíba *in utero* do 6° ao 19° dia de gestação é demonstrado na Tabela 5. Avaliações no esqueleto fetal revelaram que o óleo-resina de copaíba causou um aumento significativo, mas não dose dependente, no aumento da ocorrência de ossos incompletos (Figura 5) (osso frontal nas doses de 1000 e 1250mg/kg e osso supraocipital na dose de 500 mg/kg), que é apresentado como uma redução no tamanho da área corada no crânio (Solecki et al., 2001). Como verificado na Tabela 5, evidenciou-se nas maiores doses um aumento de ossos não-ossificados em relação

ao grupo controle (ossos supraocipital, hióide, metacarpo, metarso e ísqueo). Porém, com exceção do metarcapo, todos os outros ossos não-ossificados apresentaram-se alterados em apenas 1 ou 2 ninhadas, ou seja, um número limitado de fêmeas apresentando essa alteração e que não estavam distribuídas homogeneamente entre essas fêmeas que receberam o óleo-resina. O produto também causou aumento significativo de fetos com o centro torácico pobremente calcificado, verificado em todas as dosagens do óleo-resina. Entretanto, houve uma diminuição na ocorrência de ossos pobremente calcificados quando se tratou do arco sacral e das falanges nas maiores dosagens (Tabela 5). Outro dado significativo, foi que na maior dose testada (1250mg/kg), aumentou a incidência da costela rudimentar extra (Figura 6), uma anomalia que pode ser classificada como uma variação (Solecki et al., 2001). A ocorrência de buracos no osso escamoso (Figura 7) foi mais frequente nos fetos expostos a maior dose do óleo-resina de copaíba do que nos fetos do grupo controle.

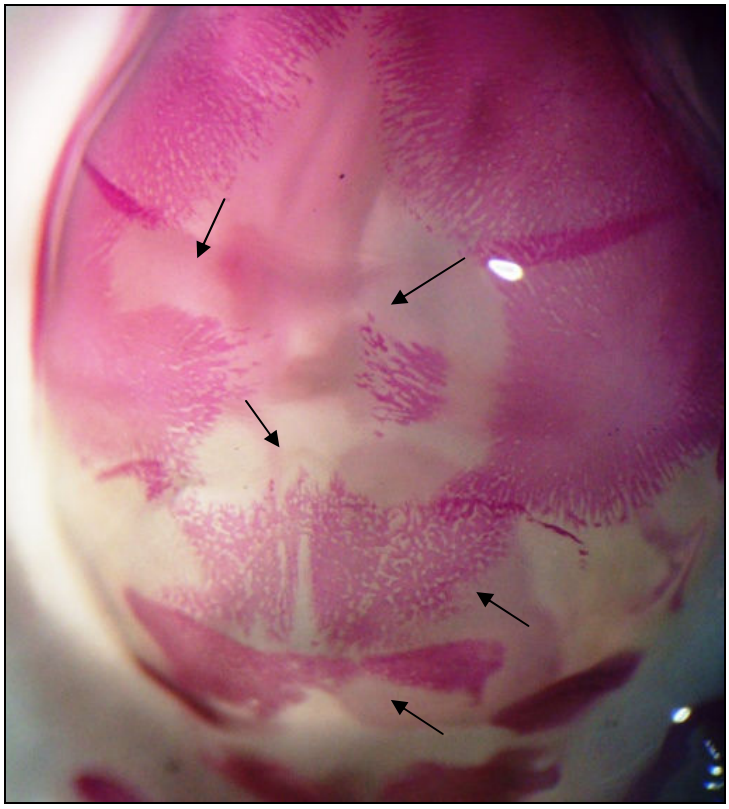


Figura 5. Ossos parietal, interparietal e supraocipital incompletos em feto exposto a 500mg/kg p.c. do óleo-resina de copaíba.

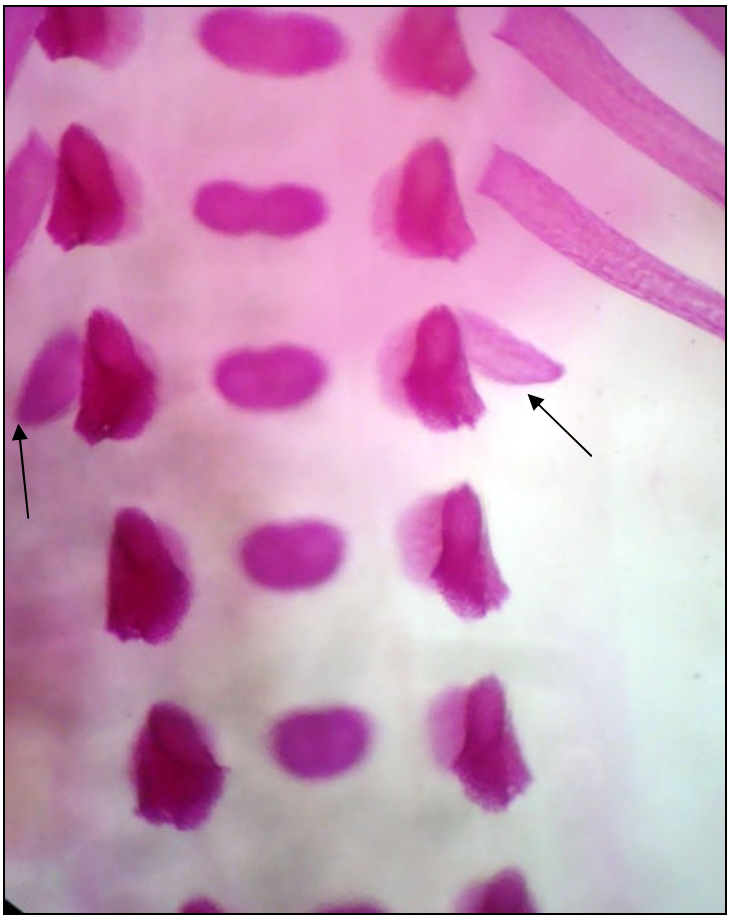


Figura 6. Costela rudimentar extra em feto exposto a 1250mg/kg p.c. do óleo-resina de copaíba.

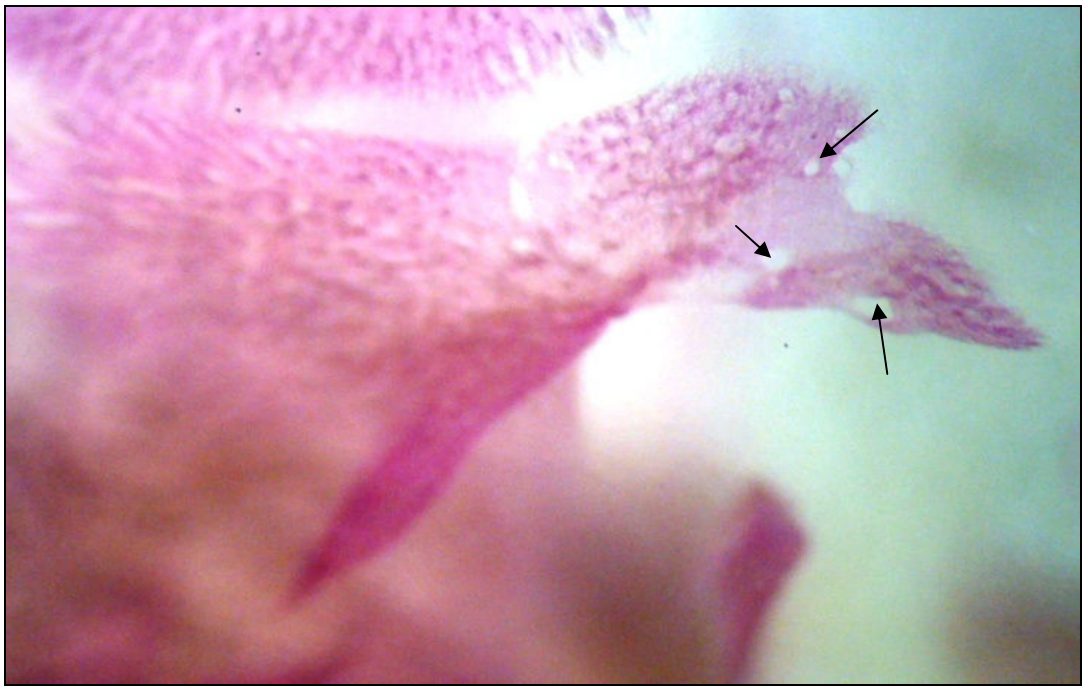


Figura 7. Buracos no osso escamoso em feto exposto a 1000mg/kg p.c. do óleo-resina de copaíba.

Tabela 5. Ocorrência de anormalidades no esqueleto dos fetos expostos *in utero* ao óleo-resina de copaíba durante a gestação

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	**1000**	**1250**
Fetos analisados (N)	106	104	128	115
Ninhadas analisadas (N)	20	17	21	21
Crânio				
Frontal (Incompleto)				
Fetos (%)	0	1	9,4*	4,3*
Ninhadas (%)	0	5,9	14,3	14,3
Frontal (buraco)				
Fetos (%)	0	0	0	0,9
Ninhadas (%)	0	0	0	4,8
Frontal (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Hióide (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	3,9*	0
Ninhadas (%)	0	0	9,5	0
Interparietal (bipartido)				
Fetos (%)	12,3	7,7	8,6	9,6
Ninhadas (%)	40	41,2	33,3	28,6
Interparietal (incompleto)				
Fetos (%)	20,8	21,2	28,1	13
Ninhadas (%)	40	52,9	61,9	47,6
Interparietal (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	2,3	0
Ninhadas (%)	0	0	9,5	0
Palatino (fenda)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0,9
Ninhadas (%)	0	0	4,8	4,8
Parietal (incompleto)				
Fetos (%)	6,6	5,8	12,5	6,1
Ninhadas (%)	20,0	29,4	23,8	23,8
Escamoso (incompleto)				
Fetos (%)	0	0	2,3	0
Ninhadas (%)	0	0	14,3	0
Escamoso (forma irregular)				
Fetos (%)	3,8	3,8	7,8	7,8
Ninhadas (%)	10	17,6	28,6	28,6
Escamoso (buraco)				
Fetos (%)	17	14,4	24,2	28,7*

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Ninhadas (%)	55	58,8	76,2	90,5*
Escamoso (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Supraocipital (bipartido)				
Fetos (%)	0	0	1,6	2,6
Ninhadas (%)	0	0	9,5	9,5
Supraocipital (incompleto)				
Fetos (%)	6,6	16,3*	11,7	13
Ninhadas (%)	25	58,8*	47,6	47,6
Supraocipital (forma irregular)				
Fetos (%)	9,4	11,5	14,8	4,3
Ninhadas (%)	35	52,9	57,1	19
Supraocipital (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	4,7*	0,9
Ninhadas (%)	0	0	9,5	4,8
Lacrimal (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Maxilar (incompleto)				
Fetos (%)	0	1	0,8	0
Ninhadas (%)	0	5,9	4,8	0
Nasal (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Parietal (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Timpânico (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Timpânico (ossificação incompleta)				
Fetos (%)	0	0	1,6	0,9
Ninhadas (%)	0	0	4,8	4,8
Zigomático (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Zigomático (incompleto)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Patas Dianteiras				
Metacarpo (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	11,3	8,7	15,6	15,7
Ninhadas (%)	25	41,2	61,9*	42,9
Metacarpo (não-ossificado)				
Fetos (%)	9,4	26,9*	33,6*	60,9*
Ninhadas (%)	35	76,5*	71,4*	76,2*
Falange (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	15,1	18,3	14,8	20,9
Ninhadas (%)	45	58,8	47,6	47,6
Falange (não-ossificada)				
Fetos (%)	12,3	15,4	10,2	7,8
Ninhadas (%)	25	64,7	33,3	28,6
Tíbia (não-ossificada)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Fíbula (não-ossificada)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Clavícula (não-ossificada)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Ulna (pobremente calcificada)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Rádio (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Patas Traseiras				
Falanges (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	29,2	34,6	23,4	17,4*
Ninhadas (%)	65	82,4	71,4	66,7
Falanges (não-ossificadas)				
Fetos (%)	20,8	22,1	19,5	27
Ninhadas (%)	45	76,5	57,1	47,6
Metatarso (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	0,9	1	2,3	2,6
Ninhadas (%)	5	5,9	14,3	9,5

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Metatarso (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	6,3*	3,5*
Ninhadas (%)	0	0	9,5	14,3
Íleo (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Íleo (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	1,6	0,9
Ninhadas (%)	0	0	4,8	4,8
Ísqueo (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	4,7*	2,6
Ninhadas (%)	0	0	4,8	9,5
Púbis (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	3,1	1,7
Ninhadas (%)	0	0	4,8	4,8
Fêmur (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Esterno				
Esternebra (bipartida)				
Fetos (%)	0,9	1,9	0	0,9
Ninhadas (%)	5	11,8	0	4,8
Esternebra (pobremente calcificada)				
Fetos (%)	24,5	22,1	29,7	30,4
Ninhadas (%)	75	64,7	85,7	76,2
Esternebra (forma irregular)				
Fetos (%)	47	51	35	43
Ninhadas (%)	19	15	14	19
Esternebra (não-ossificada)				
Fetos (%)	10	10	23	11
Ninhadas (%)	6	7	12	7
Costela				
Lombar (extra, rudimentar)				
Fetos (%)	35	44	55	75*
Ninhadas (%)	14	14	19	21*
Coluna				
Centro Sacral (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Arco Sacral (não-ossificado)				

TRATAMENTO	Grupo Controle	Copaíba (mg/kg p.c.)		
		500	1000	1250
Fetos (%)	0	0	0,8	2,6
Ninhadas (%)	0	0	4,8	9,5
Arco Sacral (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	64,2	64,4	38,3*	48,7*
Ninhadas (%)	100	94,1	76,2	90,5
Centro Torácico (DUnBbell)				
Fetos (%)	2,8	1	1,6	1,7
Ninhadas (%)	10	5,9	9,5	4,8
Centro Torácico (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	3,8	27,9*	32*	28,7*
Ninhadas (%)	20	64,7*	85,7*	71,4*
Centro Torácico (bipartido)				
Fetos (%)	0	0	0	2,6
Ninhadas (%)	0	0	0	9,5
Centro Torácico (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	2,3	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Arco Caudal (não-ossificado)				
Fetos (%)	11,3	6,7	16,4	13,9
Ninhadas (%)	45	17,6	42,9	47,6
Centro Caudal (não-ossificado)				
Fetos (%)	1,9	0	0,8	0
Ninhadas (%)	5	0	4,8	0
Arco Lombar (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	0,8	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Centro Lombar (pobremente calcificado)				
Fetos (%)	0	0	1,6	0
Ninhadas (%)	0	0	4,8	0
Vértebra Lombar (supernumerária)				
Fetos (%)	0,9	1,9	0	0,9
Ninhadas (%)	5	11,8	0	4,8
Centro Lombar (não-ossificado)				
Fetos (%)	0	0	2,3	0
Ninhadas (%)	0	0	9,5	0

Número (N). As proporções foram analisadas pelo Teste Chi-Square. * Diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.

Discussão e Conclusão

Nesse estudo, o óleo-resina de copaíba (*C. reticulata)* foi administrado em ratas prenhes durante o período de implantação embrionária até o final da gestação, segundo os procedimentos do Guia OECD-414. A implantação é o processo pelo qual o embrião adquire uma posição estável no endométrio, de modo a tornar possível a manutenção de um sistema de trocas metabólicas entre o organismo materno e embrionário. Em ratos, esse processo ocorre por volta do 6° dia de gestação (Abrahamsohn, 1993).

Como veículo do óleo-resina de copaíba utilizou-se o Tween, um surfactante não-aniônico (Benson, 1967) utilizado para solubilizar substâncias pobremente solúveis. Um estudo realizado por Ema et al. (1988) demonstrou que o Tween 60 não apresenta efeitos no desenvolvimento pré-natal de ratos. Os ratas do trabalho citado receberam Tween 60 nas doses de 0; 0,1; 1 e 10% na dieta do 7° ao 14° dia de gestação, e os resultados não relataram quaisquer evidência de teratogênese.

Sinais de toxicidade materna normalmente observados em estudos de toxicidade do desenvolvimento são diminuição no ganho de peso, diminuição no consumo de água e comida, sinais clínicos, toxicidade para os órgãos e mortalidade (Chahoud, 1999). Os dados do presente estudo demonstraram que a administração oral pré-natal do óleo-resina de copaíba causou toxicidade materna nas maiores dosagens utilizadas (1000 e 1250 mg/kg), evidenciada pela diminuição do consumo de ração após o 9° dia de gestação e perda do ganho de peso durante o período de tratamento. Embora verificada toxicidade, não houve mortes ou alterações comportamentais durante todo o tratamento. A menor dose utilizada, 500mg/kg, não causou qualquer alteração tóxica significativa, corroborando com o estudo de Gomes et al., (2007), que administrou 500 mg/kg do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae em camundongos por via oral, não observando alteração na ingestão de ração durante cinco dias após a dosagem com as duas espécies testadas.

O óleo-resina de copaíba é constituído por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos (Veiga Jr e Pinto, 2002). Alguns estudos têm sido conduzidos para avaliar a potencial embriotoxicidade de terpenos

em animais de laboratório. Num estudo conduzido com citral (3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-al), encontrado em óleos essenciais, foi administrado oralmente em ratos Wistar do 6° ao 15° de gestação em doses de 60; 125; 250; 500 e 1000 mg/kg. Os resultados demonstraram uma diminuição no ganho de peso do 6° ao 11° dia de gestação nas menores doses, e uma redução no [peso corpóreo menos o peso do útero] nas maiores doses, indicando que o citral foi maternalmente tóxico para todas as dosagens testadas (Nogueira et al., 1995). Araujo et al. (1996) avaliaram o potencial efeito embriofetotóxico do α-terpineno (1-isopropil-4-metil-1,3-ciclohexadieno), um monoterpeno encontrado em óleos essenciais, após administração via oral (30, 60, 125 e 250 mg/kg pc) em fêmeas Wistar do 6° ao 15° dia de gestação. Não houve aumento na taxa de reabsorções/implantações nas doses testadas, mas foi verificada uma redução no [peso corpóreo menos o peso do útero] nas duas maiores doses testadas, evidenciando toxicidade materna. Houve uma diminuição no peso corpóreo fetal na maior dose testada e alguns sinais de retardo na ossificação foram observados nas doses de 60 mg/kg ou mais.

Paumgartten et al. (1998) investigaram os efeitos da administração oral do monoterpeno β-mirceno nas doses de 0, 100, 300 e 500 mg/kg em ratos. Metade das fêmeas do estudo receberam o monoterpeno pelo período de 21 dias anterior ao acasalamento, durante o acasalamento e até a cesárea no 21° dia de gestação. Não foram observados sinais de toxicidade materna durante o estudo, entretanto um pequeno aumento no peso do fígado e dos rins foi verificado. Essa alteração foi explicada pelo fato do β-mirceno ser um provável indutor da monooxigenase hepática e o aumento do fígado ser um resultado da acentuada hipertrofia do retículo endoplasmático, devido a uma indução da síntese de enzimas microssomais nos animais tratados. No presente estudo, dados similares foram relatados ao se verificar um acentuado aumento no peso relativo do fígado e rins das fêmeas tratadas com do óleo-resina de copaíba. Os resultados das avaliações pós-cesárea indicaram que a administração do óleo-resina não ocasionou efeitos adversos significativos na perda pós-implantação, reabsorções, tamanho da ninhada e razão sexual (machos e fêmeas). Uma pequena, mas significativa, redução na média do peso corpóreo fetal nas maiores dosagens de copaíba foi verificada. Essa redução no peso fetal coincidiu com a as dosagens de copaíba que se apresentaram tóxicas para as mães. Nos estudos de toxicidade no desenvolvimento, uma redução na média do peso corpóreo

fetal é normalmene considerado um resultado no retardo do crescimento pré-natal induzido por uma substância (Chahoud, 2005). Entretanto, Khera (1985) demonstrou que algumas substâncias induzem efeitos no desenvolvimento em nível de dose que é também maternalmente tóxico, desta forma diminui a significância da toxicidade fetal na presença de sinais de toxicidade materna.

A redução no consumo de alimento ou malnutrição materna pode comprometer o crescimento fetal e a ossificação (Lederman e Rosso, 1980). O extrato de *Ginkgo biloba,* planta composta por diferentes terpenos trilactonas, foi testado em ratos Wistar para avaliar a toxicidade reprodutiva. As fêmeas prenhes receberam 0; 3,5; 7 e 14 mg/kg p.c. do extrato do 8° ao 20° dia de gestação. Não foram observadas evidências de toxicidade materna, entretanto os resultados indicaram um retardo no crescimento intra-uterino demonstrado através da diminuição da média do peso fetal (Pinto et al., 2007). Delgado et al. (1993) avaliaram o efeito do β-mirceno no desenvolvimento peri- e pós-natal, pela administração de 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg, via gavagem a fêmeas Wistar desde o 15° dia de gestação e durante a lactação (até o 21° pós-natal). Houve diminuição no peso da prole das fêmeas tratadas com a maior dose do estudo.

As análises de anormalidades externamente visíveis dos fetos não demonstraram quaisquer alterações significativas. Já a avaliação das anomalias viscerais revelou uma discreta dilatação no ureter direito e esquerdo, significativas, mas não dose dependentes nos grupos 500 e 1250 mg/Kg do óleo-resina de copaíba. A classificação harmonizada da terminologia e classificação de vísceras e avaliações externas dos fetos de ratos determina que a dilatação verificada no ureter dos fetos são transitórias e podem ser consideradas como variações (Solecki et al., 2003). De acordo com as definições atuais, as variações são mudanças estruturais que ocorrem em uma população normal e não são susceptíveis de afetar a sobrevivência ou a saúde, enquanto que as malformações são mudanças permanentes, que afetam adversamente a sobrevivência, desenvolvimento ou função (Chahoud et al., 1999).

A exposição pré-natal do óleo-resina de copaíba aumentou principalmente a frequência de ossos não-ossificados e incompletos da prole. Em ratos, ossos não-ossificados (Khera, 1985) bem como ossificação incompleta e ossos pobremente ossificados (Solecki et al., 2001) tem sido um indicador de retardo de ossificação do

esqueleto fetal, que é um termo que se refere a uma diminuição na quantidade de mineralização do osso em comparação com o esperado para uma determinada idade de desenvolvimento (Carney e Kimmel, 2007). Segundo Solecki et al. (2001), normalmente, não se pode saber exatamente as consequências pós-natais dos ossos incompletos e estudos avaliando as consequências pós-natais do retardo na ossificação têm indicado que elas não persistem (Carney e Kimmel, 2007). A maioria dos pesquisadores classifica ossos não-ossificados como variações (ausência de ossificação), sendo uma forma extrema da ossificação incompleta, condição considerada transitória e que se resolve com o crescimento do indivíduo, alcançando um estágio comparável ao do grupo controle. Num dia particular da gestação, algumas estruturas do crânio podem ser bem ossificadas, algumas podem ser menos ossificadas e outras podem não ser ossificadas (Solecki et al., 2001). De acordo com Daston and Seed (2007), o retardo na ossificação depende da idade na qual os animais foram sacrificados; assim, alguns estudos demonstram que os fetos das fêmeas sacrificadas no dia 20° de gestação (DG) tem ossos muito menos ossificados que os animais examinados no 21° DG. No presente estudo, seguindo o Guia OECD-414, as cesáreas foram realizadas no 20° dia de gestação.

O retardo na ossificação ocorre tipicamente em conjunto com outros efeitos no crescimento fetal, particularmente diminuição do peso fetal, como foi verificado no presente estudo. Normalmente o atraso na ossificação é provavelmente indicativo do mesmo problema que levou a uma diminuição do peso fetal, ou seja, um efeito generalizado sobre a maturação fetal. Isso pode ser um efeito adverso, mas provavelmente não é um preditor de potencial teratogênico (Daston e Seed, 2007).

Outro resultado do presente estudo foi o aumento de buracos no osso escamoso, signicativos nas doses de 1000 mg/kg. Pode-se classificar esses buracos pequenos e pouco numerosos como uma variação (Solecki et al., 2001). Além disso, a incidência do aparecimento da costela rudimentar extra aumentou com o incremento da dose e foi significativo no grupo 1250 mg/kg. Mesmo no estudo de substâncias teratogênicas para ratos, como é o caso da aspirina, essa alteração é transitória. Wickramaratne (1988) administrou aspirina em ratos prenhes, resultando em duplicação da frequência de costelas extras rudimentar na prole ao nascer. No entanto, após 60 dias, a ocorrência das costelas extras na prole declinou a zero.

Os resultados deste estudo indicam que o óleo-resina de copaíba foi tóxico para o organismo materno nas doses de 1000 mg/kg e 1250 mg/kg, como pode ser visto pela redução no ganho de peso das mães e pela diminuição no consumo de ração também nas maiores doses durante o período do tratamento. Nesses níveis de dose, o óleo-resina também afetou adversamente o desenvolvimento embriofetal de ratos, causando retardo no crescimento fetal, evidenciada pela diminuição do peso da prole. Nestas condições experimentais, o nível máximo de dose em que não são observados efeitos adversos (*Non-Observed Adverse Level* – NOAEL) foi de 500 mg do óleo-resina de copaíba/kg de peso corporal, *i.e.* NOAEL=500 mg do óleo-resina de copaíba/kg pc/dia.

No presente estudo, a administração do óleo-resina nos ratos ocorreu a partir do sexto dia da gestação, que corresponde ao início da implantação embrionária. Em mulheres, a implantação ocorre no final da primeira semana de gestação (Moore, 2000). A partir do NOAEL estimado, podemos calcular a ingestão segura do óleo-resina de copaiba por mulhers grávidas aplicando-se o fator de segurança de 100, segundo procedimentos internacionalmente aceitos (Speijers, 1999; Jardim & Caldas, 2009). Este fator assume que o homem é 10 vezes mais sensível que o rato (variabilidade inter-espécies) e que na população humana existe uma sub-população de indivíduos que é 10 vezes mais sensível que a média da população (variabilidade intra-espécie). Desta maneira, a ingestão segura do óleo-resina de copaiba durante o período gestacional é de 5 mg/kg pc/dia, ou 5 mL/kg pc/dia, considerando a relação peso:volume 1:1.

Vários produtos do óleo-resina de copaiba estão disponíveis comercialmente no Brasil, mas na grande maioria a posologia não está especificada no rótulo. Pesquisa junto às drogarias do DF e em sites que comercializam o produto na internet indicam que o óleo-resina deve ser usado de 3 a 5 gotas por vez, até 3 vezes ao dia. Considerando que 1 gota tem 0,05 mL, a dose diária máxima recomendada é de 0,75 mL/dia. Assumindo um peso corpóreo médio de 60 kg, essa dose corresponde a 0,0125 mL/kg pc/dia, isto é, 400 vezes menor que a ingestão segura estimada para mulheres gestantes a partir do estudo com ratos. Esses resultados indicam que o uso de óleo-resina de copaiba pode ser seguro para esta população, o que não suporta cientificamente o alerta apresentado em vários produtos comerciais de que o óleo-resina “não deve ser usado por gestantes”.

Os dados aqui apresentados indicam ainda que o óleo-resina de copaíba não é teratogênica em ratos, uma vez que não houve aumento da freqüência de malformações viscerais e/ou esqueléticas grosseiras em conseqüência da exposição *in utero* a este composto. Algumas das referências citadas no presente estudo demonstraram que os terpenóides estudados até o momento não foram teratogênicos. É importante, no entanto, destacar que o estudo da toxicidade reprodutiva de agentes químicos é uma das áreas mais complexas da toxicologia preditiva (Pinto, 2005), e que na presente investigação, somente um período restrito deste processo, *i.e.* o desenvolvimento embriofetal foi avaliado.

Referências

Abrahamsohn PA, Zorn TM 1993. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266(6):603-28.

Amorim, J de A 1999. Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integraçäo nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Tese apresentada a Universidade de Säo Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento Prática de Saúde Pública.

Araujo IB, Souza CAM, De-Carvalho RR, Kuriyama SN Rodrigues RP, Vollmer RS, Alves EN, Paumgartten FJR 1996. Study of the embryofoetotoxicity of α-terpinene in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 3(5):477-482.

Benson FR 1967. In ‘’Nonionic surfactantes’. MJ Schick, eds., Marcel Dekker, New York, p.247.

Carney EW and Kimmel CA 2007. Interpretation of Skeletal Variations for Human Risk Assessment: Delayed Ossification and Wavy Ribs. *Birth Defects Research* (Part B) 80:473–496.

Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B 2005. Topical antiinflamatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950.

Chahoud I and Paumgartten FJ 2005. Relationships between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification. *Braz J Med Biol Res* 38(4):565-75.

Chahoud I, Buschmann J, Clar KR, Druga A, Falke H, Faqi A, Hansen E, Heinrich-Hirsch B, Hellwig J, Lingk W, Parkinson M, Paumgartten FJ, Pfeil R, Platzek T, Scialli AR, Seed J, Stahlmann R, Ulbrich B, Wu X, Yasuda M, Younes M, Solecki R 1999. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. *Reprod Toxicol* 13:77–82.

Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L and Faqi AS 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 13(5):375-381.

Costa DH, Ferreira CAP, Silva JNM, Lopes J do CA 1998. Potencial madeireiro de floresta densa no município de Mojú, Estado do Pará. Belém: Embrapa-CPATU. 33p (Embrapa – CPATY. Documentos, 121).

Cunha KMA, Paiva LA, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS 2003. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on the rat uterus in vitro. *Phytother Res* 17: 320-324.

Daston GP and See J 2007. Skeletal Malformations and Variations in Developmental Toxicity Studies: InterpretationIssues for Human Risk Assessment. *Birth Def Res (Part B)* 80:421–424.

Dawson AB 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technol* 1:123–4.

De Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PR, Lima GG, Torres SM, de Vasconcelos RC 2009. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg* 33(1):104-9.

Delgado IF, Almeida Nogueira ACM de, Souza CAM, Costa AMN, Figueiredo LH, Mattos AP, Chahoud I, Paumgartten FJR 1993. Peri- and postnatal developmental toxicity of β-myrcene in therat. *Food Chem Toxicol* 31(9): 623-628

Ema M, Itami T, Kawasaki H and Kanoh S 1988. Teratology Study of Tween 60 in

Rats. *Drug and Chemical Toxicology* 11(3):249-260.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes P.D 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmaco* 109: 486-492.

Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin, 14–16 September 2000. *Reprod Toxicol* 15(6):713–721.

Jardim ANO, Caldas ED. 2009. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32 (7), 1898-1909.

Khera KS 1985. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratol* 31(1):129-53.

Lederman SA and Rosso P 1980. Effects of food restriction on fetal and placental growth and maternal body composition. *Growth* 44:77–88.

Lima SRM, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 17: 1048-1053.

Miranda ES, Miekeley N, De-Carvalho RR, Paumgartten FJ 2006. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. *Reprod Toxicol* 21(3):292-300.

Nogueira ACMA, de Carvalho RR, Souza CAM, Chahoud I and Paumgartten FJR. Study on the embriofetotoxicity of citral in the rat 1995. *Toxicol* 96:105-113.

OECD's Guideline for the Testing of Chemicals – n° 414: “Prenatal Developmental Toxicity Study’’ (Adopted: 22nd January 2001).

OECD's Guideline for the Testing of Chemicals – n° 423: “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” (orientações atualizadas, adotadas em 17 de dezembro de 2001).

Oliveira ECP, Lameira AO, Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. Rev *Bras Plant*

Medic 8: 14-23.

Paumgartten FJ, De-Carvalho RR, Souza CA, Madi K, C Chahoud I 1998. Study of the effects of beta-myrcene on rat fertility and general reproductive performance. *Braz J Med Biol Res* 31(7):955-65.

Pinto FCM 2005. Estudo da embriotoxicidade da Beta-Ionona em ratos. Tese de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz/ Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca- RJ.

Pinto RM, Fernandes ES, Reis JEP, Peters VM, Guerra MO 2007. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reprod Toxicol* 23:480–485.

Sachetti CG, Fascineli ML, Sampaio JA, Lameira OA, Caldas ED 2009. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico da copaíba. *Rev Bras Farmacog* No prelo.

Salewski E 1964. F¨arbemethoden zum makrokospischen Nachw eis von Implantationsstellem am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's. *Arch Exp Pathol Pharmakol* 281:367.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV 2008. Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis. J Ethnopharmacol 20; 120(2):204-8.

Solecki R, Bergmannb B, Burgin H, Buschmann J, Clark R, Druga A, et al. 2003. Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. *Reprod Toxicol* 17:625–637

Solecki R, Burgin H, Buschmann J, Clark R, Duverger M, Fialkowski O, et al. 2001.

Speijers, GJA. Precision of Estimates of an ADI (or TDI or PTWI). 1999. *Regul Toxicol and Pharmacol* **30,** S87–S93.

Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG, Hernández BV 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Plant Med* 68:808-812.

Veiga Júnior VF e Pinto AC 2002. O gênero *Copaifera* L. *Quim Nova* 25: 273-286.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 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 Ethnopharm* 112: 248-254.

Wickramaratne GA 1988. The post-natal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies. *J Appl Toxicol* 8(2):91-4.

CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados do estudo de toxicidade aguda demonstraram que a administração do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) em ratas Wistar não causou mortalidade e/ou morbidade até a dose testada de 2000 mg/kg pc e foi classificada como “categoria 5”, ou seja, toxicidade letal aguda maior que 2000 mg/kg pc. O óleo-resina não apresentou efeitos neurotóxicos nas doses testadas, avaliada pela atividade motora, sensorial e comportamental. Não foi encontrada qualquer alteração histopatológica significativa no fígado, rim e cérebro das fêmeas prenhes expostas do óleo-resina de copaíba, sugerindo uma segurança relativo quando utilizado durante a gestação.

Os dados do estudo de embriofetotoxicidade indicam que o óleo-resina de copaíba não é teratogênica em ratos, uma vez que não houve aumento da freqüência de malformações viscerais e/ou esqueléticas grosseiras em conseqüência da exposição *in utero* a este composto. O óleo-resina foi tóxico para o organismo materno e causou retardo no crescimento fetal nas doses de 1000 mg/kg pc/dia e 1250 mg/kg pc./dia, com NOAEL estimado de 500 mg/kg pc/dia. A partir desse NOAEL, estimou-se que a ingestão segura do óleo-resina de copaiba durante o período gestacional na espécie humana é de 5 mg/kg pc/dia, ou 5 mL/kg pc/dia. Essa dose 400 vezes maior que a dose terapêutica indicada nos produtos comerciais e portanto a copaíba é segura para ser usada por mulheres em idade fértil.

Até o presente momento, não existiam dados na literatura avaliando a embriofetotoxicidade do óleo-resina de copaíba, dado importante pela sua grande utilização tradicional e popular. A continuação dessa avaliação se faz necessária, devido à grande diferença intra-espécies das *Copaiferas* bem como a diferença entre espécies animais. A gestação é uma condição fisiológica na qual o metabolismo materno pode ser influenciado por agentes tóxicos, que podem afetar a implantação, desenvolvimento e crescimento do feto. Além disso, são necessários estudos da cinética desta planta, ausentes na literatura atual e importante para entender diversos mecanismos. Compostos químicos do óleo-resina de copaíba também deverão ser isolados com o intuito de investigar os mecanismos de ação nas suas diversas ações farmacológicas e tóxicas.

(Obs: a referencia é um site não-cientifico

http://loirahgelada.blogspot.com/2008/08/doenas-mais-comuns-em-ratos.html