

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO-RESINA DA COPAÍFERA RETICULATA EM MODELO INFLAMATÓRIO DE EDEMA DE PATA¹

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE OIL-RESIN COPAIFERA RETICULATA OF MODEL INFLAMMATORY PAW EDEMA

José Wagner Cavalcante MUNIZ², Patrícia Torres BOZZA³, José Luiz Martins DO NASCIMENTO⁴ e Patrícia Alves REIS⁵

RESUMO

Objetivo: avaliar a ação do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* como anti-inflamatório em modelos experimentais de reação inflamatória aguda. **Método:** o estudo experimental foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ, foram utilizados 30 (trinta) camundongos da linhagem *Swiss Webster* (SW). O óleo-resina de copaíba utilizada foi extraído de árvore da espécie *Copaifera reticulata*. O modelo de inflamação aguda induzida por carragenina foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório das concentrações, foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparar os valores medianos conforme os grupos com nível de significância alfa = 0,05. **Resultados:** no grupo C500 ocorreu significativa redução do volume no instante T3; somente os grupos Indo e C10 apresentaram significativa redução do volume em T6. Não houve diferença estatisticamente significativa no Índice de Inibição do Edema nos grupos (Indo, C10, C100 e C500) nos instantes T1, T3 e T6. **Conclusão:** a atividade anti-inflamatória do óleo-resina foi confirmada pelo modelo do edema de pata induzido por carragenina através da redução do volume deslocado.

DESCRITORES: *copaifera reticulata*, edema de pata, índice de edema.

INTRODUÇÃO

As árvores "copaibeira", assim denominadas popularmente, são plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* L. (Leguminosae – Caesalpinaceae) uma espécie arbórea encontrada principalmente nos biomas da bacia Amazônica e no cerrado com 28 espécies catalogadas, das quais 16 são endêmicas do Brasil^(1,2), apresentando no interior do seu tronco um óleo-resina ou bálsamo^(3,4,5). 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, sendo que os canais de uma zona não têm comunicação com outra⁽⁶⁾.

No que se refere à composição química dos óleos-resinas das espécies de *Copaifera*, observa-se a predominância de sesquiterpenos, como o α -humuleno, α e β -selineno, β -bisaboleno e β -cariofileno^(7,5); sendo o β -bisaboleno possui propriedades anti-inflamatória e analgésica e o β -cariofileno é descrito na literatura como antiedêmico, anti-inflamatório, bactericida e insetífugo^(8,9). Além de diterpeno descrito na literatura como antiparasitário e atividade antimicrobiana⁸.

A composição química dos óleos de copaíba encontra-se citada em vários artigos científicos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como, metodologias modernas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com colunas cromatográficas^(7,8,9).

MÉTODOS

Realizado no Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa de Animais.

Animais experimentais

Foram utilizados 30 (trinta) camundongos da linhagem *Swiss Webster* (SW) macho com peso de 25 a 35g procedentes do Biotério da Fundação Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Fisiologia / Laboratório de Imunofarmacologia / Pavilhão Osório de Almeida.

1 – Trabalho realizado no Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

2 – Doutorando. Universidade Federal do Pará. Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular.

3 - Pós-Doutorado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica.

4 - Pós-Doutorado. Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia. Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular.

5 – Doutorado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica.

Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas coletivas, com no máximo seis animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo fotoperíodo de 12 horas claro / escuro e alimentado, ração e água *ad libitum*, os quais foram fornecidos apenas durante o ciclo claro (7 – 19 horas).

Coleta do óleo-resina de copaíba

O óleo-resina de copaíba utilizada foi extraído de árvore da espécie *Copaifera reticulata*, família das *Leguminoosae* (divisão *Caesalpinioideae*). Obtido na Estação Científica Ferreira Penna – ECFPn na Floresta Nacional de Caxiuanã, localizada no município de Melgaço no Estado do Pará, administrada pelo Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG em Belém – Pará, com a identificação botânica do material coletado feita pelo Dr. Antônio Sérgio Lima da Silva, Pesquisador do Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG, Belém, Pará, Brasil.

Preparo do óleo-resina para tratamento via oral

Para o teste farmacológico da *copaifera reticulata* nos modelos experimentais estudados o óleo-resina foi diluído em etanol 15%, tween 20 1,25% em solução de salina fisiológica. As doses testadas foram de 10, 100 e 500 mg/kg/p.c., preparadas em diluição seriada.

Modelo de edema de pata

O modelo de inflamação aguda induzida por carragenina (Cg) descrito previamente¹⁰ foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório dos extratos da espécie *Copaifera Reticulata*. Os grupos de animais (n = 6/grupo) foram tratados por via oral (v.o.) com dose de: 10mg, 100mg e 500mg do óleo-resina de copaíba (solução em tween 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica) sendo 200 µL/animal; 01 hora antes da injeção subplantar de 50 µL de carragenina (6 mg/mL) em salina estéril administrada na região subplantar da pata direita. Como controle positivo de ação anti edematogênica, um grupo foi tratado com indometacina (em Na₂CO₃ 0,2%) na dose de 10 mg/kg/p.c., administrada por via intraperitoneal (i.p.). O edema de patas foi avaliado em pletismômetro

(*Plethysmometer* modelo 7140, Ugo Basile, Itália) pela diferença de volume das patas no tempo zero (t₀) e em diferentes intervalos de tempo após a injeção de carragenina (t_x). O índice de edema (IE) e Índice de inibição do edema (IIE) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

QUADRO 1: Formula de calculo do índice de edema e índice de inibição de edema.

$$IE = \frac{\text{Volume da pata direita em } t_x - \text{Volume da pata direita em } t_0}{\text{Volume da pata direita em } t_0} \times 100$$

$$\text{Índice de Inibição de Edema} = \frac{\text{Média IE}_{t_x} - \text{IE}_{t_x}}{\text{Média IE}_{t_x}} \times 100$$

FONTE: Protocolo de pesquisa – 2009.

Método estatístico

Para verificar a atividade anti edematogênica nas concentrações do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata*, foi aplicado análise de variância (ANOVA) de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn, com nível de significância de 5%, para detectar variações dentro e entre as amostras, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O processamento dos dados foi suportado pelos softwares *BioEstat* versão 5.0 e *Graph Pad PRISM* versão 4.

RESULTADOS

A análise transversal referente ao T0 o p-valor = 0.0811 indica que os grupos apresentam volumes estatisticamente iguais no instante inicial. No intervalo transversal referente ao T1 os grupos C10, C100 e C500 apresentaram menor volume (p-valor < 0.05) da pata dos camundongos uma hora após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Ocorreu diferença significativa entre os grupos Cg e Indo (p-valor < 0.05). Não houve real diferença estatística entre os grupos tratados com copaíba e Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor > 0.05.

No intervalo transversal referente ao T3, em relação ao grupo Cg os grupos C100 e C500 apresentaram menor volume (p-valor < 0.05) três horas após a introdução do agente inflamatório. Não houve real diferença estatística entre os grupos tratados com copaíba e

indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor > 0.05.

No intervalo transversal referente ao T6, em relação ao grupo Cg os grupos C10 e C500 apresentaram redução do volume (p-valor < 0.05) seis horas após a

introdução do agente inflamatório. Houve real diferença entre o grupo tratado com C100 e o grupo Indometacina, sendo que o grupo C100 apresentou volume significativamente maior que o grupo Indo (p-valor < 0.05), conforme Quadro 2.

QUADRO 2: Volume conforme os Instantes (T0, T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500).

Volume (ml)	Cg (n=6)	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor	p-valor<0.05*
T0						0.0811	
Média±dp	0.125±0.008	0.14±0.009	0.142±0.016	0.133±0.010	0.140±0.011		
Mediana	0.120	0.140	0.140	0.130	0.140		
(1ºQ, 3ºQ)	0.12, 0.128	0.132, 0.148	0.14, 0.14	0.13, 0.138	0.13, 0.150		
T1						0.0048*	G:1-2,1-3,1-4,1-5
Média±dp	0.213±0.010	0.18±0.011	0.176±0.022	0.181±0.023	0.161±0.015		
Mediana	0.220	0.180	0.175	0.180	0.165		
(1ºQ, 3ºQ)	0.205, 0.220	0.18,0.188	0.162, 0.188	0.162, 0.190	0.152, 0.170		
T3						0.0042*	G:1-2,1-4,1-5
Média±dp	0.243±0.023	0.195±0.029	0.207±0.018	0.170±0.013	0.180±0.015		
Mediana	0.245	0.195	0.215	0.200	0.180		
(1ºQ, 3ºQ)	0.225, 0.25	0.183, 0.215	0.195, 0.22	0.193, 0.200	0.170, 0.190		
T6						0.0091*	G:1-2,1-3,1-5,2-4
Média±dp	0.21±0.027	0.163±0.018	0.171±0.019	0.186±0.019	0.175±0.010		
Mediana	0.200	0.155	0.165	0.190	0.175		
(1ºQ, 3ºQ)	0.193, 0.215	0.150, 0.175	0.160, 0.17	0.175, 0.1975	0.170, 0.18		
p-valor	0.0007*	0.0022*	0.0016*	0.0021*	0.0029*		
p-valor<0.05*	T0-T1 T0-T3 T0-T6	T0-T1 T0-T3	T0-T1 T0-T3	T0-T1 T0-T3 T0-T6	T0-T3 T0-T6		

Fonte: Estudo Experimental.

Nota: 1-Cg, 2-Indo, 3-C10, 4-C100, 5-C500

* ANOVA de Kruskal-Wallis

Prospectivamente (T0 → T1 → T3 → T6), o grupo C500 foi o único que não apresentou aumento significativo do volume entre os instantes T0 e T1.

Somente os grupos Indo e C10 apresentaram significativa redução do volume em T6, conforme figura 1.

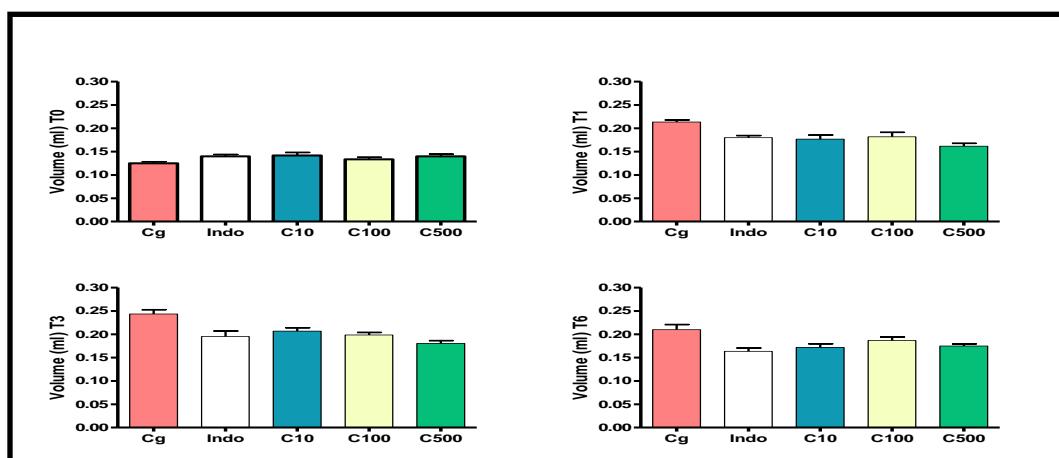


Figura 1: Evolução do Volume nos grupos Cg, Indo, C10, C100 e C500 nos instantes T0, T1, T3 e T6.

No intervalo transversal referente ao T1 os grupos C10 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor <0.05) uma hora após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Não houve real diferença entre os grupos tratados com copaíba e Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor >0.05.

No intervalo transversal referente ao T3 os grupos C10, C100 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor < 0.05) três horas após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Não houve real diferença entre os

grupos tratados com copaíba e Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor >0.05.

No intervalo transversal referente ao T6 os grupos C10 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor <0.05) da pata dos camundongos seis horas após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Houve real diferença entre o grupo tratado com C100 e Indometacina, sendo que o grupo C100 apresentou mais altos índices de edema que o grupo Indometacina, p-valor < 0.05, conforme Quadro 3.

QUADRO 3: Índice do Edema os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500).

Índice do Edema	Cg (n=6)	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor	p-valor<0.05*
T1						0.0063*	G:1-2,1-3,1-5
Média±dp	71.46±15.93	29.10±12.71	26.58±26.12	37.06±21.68	15.81±11.10		
Mediana	76.28	27.86	17.86	28.72	16.67		
(1ºQ, 3ºQ)	67.31, 83.33	20.00, 37.77	8.93, 32.14	23.97, 51.44	9.103, 22.31		
T3						0.0048*	G:1-2,1-3,1-4,1-5
Média±dp	96.06±28.07	38.82±14.12	47.99±24.94	50.01±20.53	29.57±18.23		
Mediana	104.17	53.67	44.23	50.00	28.72		
(1ºQ, 3ºQ)	76.92, 108.33	51.55, 66.54	40.51, 64.68	43.68,53.85	16.67, 42.31		
T6						0.0021*	G:1-2,1-3,1-5,2-4
Média±dp	68.89±26.9	17.23±16.16	22.22±17.41	40.15±11.46	25.56±11.56		
Mediana	58.33	11.26	17.86	37.48	21.54		
(1ºQ, 3ºQ)	54.97, 77.08	6.79, 30.63	14.29, 30.36	33.01, 49.20	20.0, 28.85		
p-valor	0.2006	0.0544	0.1847	0.5644	0.3282		

Fonte: Estudo Experimental.

Nota: 1-Cg, 2-Indo, 3-C10, 4-C100, 5-C500

* ANOVA de Kruskal-Wallis

Prospectivamente (T1 → T3 → T6) não houve diferença estatisticamente significativa no Índice do Edema, dentro dos

grupos (Cg, Indo, C10, C100 e C500), entre os instantes T1, T3 e T6, conforme figura 2.

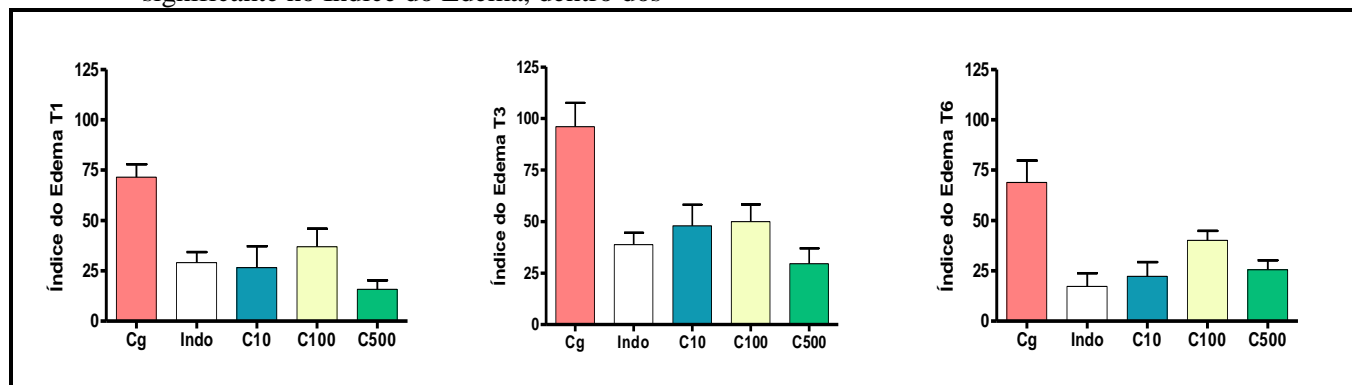


Figura 2: Índice do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500).

No intervalo transversal não houve significância estatística entre os grupos

Tratados e o Controle, conforme Quadro 4.

QUADRO 4: Índice de Inibição do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Indo, C10, C100, C500).

Índice de Inibição do Edema	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor
T1					0.2278
Média±dp	59.27±17.78	62.81±36.56	48.13±30.34	77.87±15.54	
Mediana	61.01	75.01	59.81	76.67	
(1°Q, 3°Q)	47.13, 72.01	55.01, 87.50	28.0, 66.45	68.78, 87.26	
T3					0.2669
Média±dp	59.58±14.70	50.04±25.96	47.94±21.37	69.21±18.98	
Mediana	53.67	44.23	47.95	70.10	
(1°Q, 3°Q)	51.55, 66.54	40.51, 64.68	43.95, 54.53	55.96, 82.65	
T6					0.0776
Média±dp	75.00±23.46	67.75±25.27	41.72±16.63	62.91±16.79	
Mediana	83.65	74.08	37.48	68.74	
(1°Q, 3°Q)	55.54, 90.15	55.94, 79.27	33.01, 49.20	58.13, 70.97	
p-valor	0.4131	0.4201	0.6753	0.3175	

Fonte: Estudo Experimental.

Prospectivamente (T1 → T3 → T6): Não houve significância estatística

quanto à inibição do edema em cada um grupo, conforme figura 3.

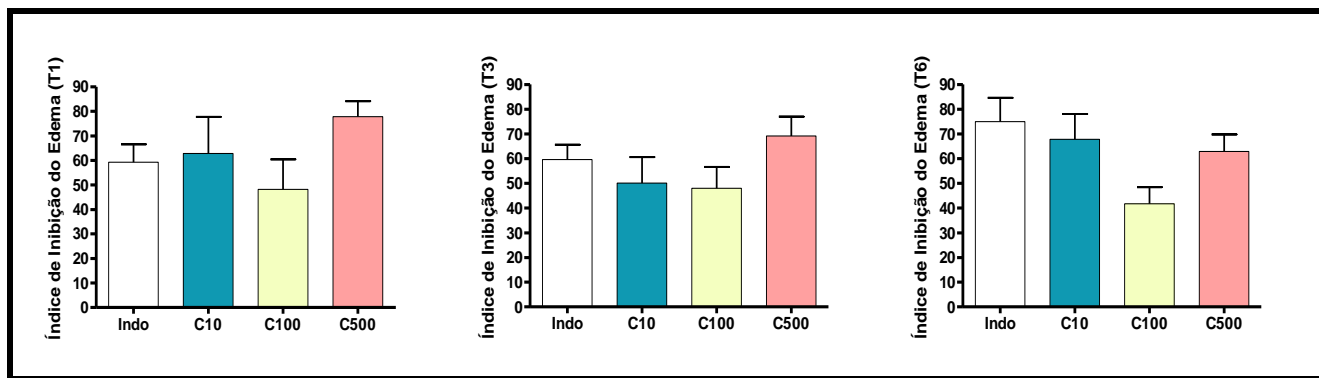


Figura 3: Índice de Inibição do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Indo, C10, C100, C500).

DISCUSSÃO

O edema provocado pela carragenina (Cg) ocorre em três fases^(12,13). Na primeira hora após a injeção de carragenina (Cg), o aumento da permeabilidade vascular é mediado por histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é mediado por cininas. A fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenina (Cg) e caracteriza a ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar⁽¹²⁾.

O óleo-resina de *copaifera reticulata* reduziu o edema de pata induzido por carragenina após 1, 3, e 6 horas, sendo que no grupo C500 no T3 ocorreu o menor volume e menor índice. Portanto os resultados são indicativos de que os componentes do óleo-resina de *copaifera reticulata* estejam agindo na inibição da liberação de mediadores químicos da inflamação via prostaglandinas, indicando assim a presença no extrato de constituintes com ação anti-inflamatória e antiedematogênica.

CONCLUSÃO

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina de *copaifera reticulata* foi confirmada pelo modelo do edema de pata induzido por carragenina, através da redução do volume deslocado e redução do índice de edema. Como agente inflamatório, a carragenina induz inflamação pela liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de

edema. Anti-inflamatórios não-esteróides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina⁽¹⁴⁾. O óleo-resina de *copaifera reticulata* testado possui ação semelhante a este anti-inflamatório em concentrações elevadas como a testada de 500 mg/kg/p.c, porém, mais testes são necessários para comprovar esta afirmação.

SUMMARY

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE OIL-RESIN COPAIFERA RETICULATA OF MODEL INFLAMMATORY PAW EDEMA

José Wagner Cavalcante MUNIZ, Patrícia Torres BOZZA, José Luiz Martins DO NASCIMENTO e Patrícia Alves REIS

Objective: To evaluate the action of the oil-resin of Copaiba *Copaifera reticulata* as anti-inflammatory effect in experimental models of acute inflammatory reaction. **Method:** A total of 30 (thirty) mice of Swiss strain Webster (SW). The oil-resin of Copaiba used was extracted from tree species *Copaifera reticulata*. The model of acute inflammation induced by carrageenan was used to evaluate the anti-inflammatory effect of the extracts, we used the statistical test of Kruskal-Wallis test to compare the median values for the different groups with a significance level $\alpha = 0.05$. **Results:** The group C500 was a significant reduction in the volume at time T3, only the Indo and C10 groups showed significant reduction in volume at T6. There was no statistically significant difference in the Index of Inhibition of edema in groups (Indo, C10, C100 and C500), in the instant, T1, T3 and T6. **Conclusion:** The anti-inflammatory activity of oil-resin was confirmed by the model of paw edema induced by carrageenan by reducing the volume displaced.

KEY WORD: *Copaifera reticulata*, paw edema, index of edema.

REFERÊNCIAS

1. CASCON, V. & GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, v.55, 773-778, 2000.
2. DWYER, J.D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpinaceae). *Brittonia* 7 (3), 143-172. 1951.
3. MESQUITA, J.B. Estudos dos processos de obtenção e qualidade do óleo essencial de óleo copaíba (*Copaifera langsdorffii* Bent.). Lavras: UFLA, 93p. (Monografia)-UFLA, MG. 1989.
4. MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VALDIR, F. & VEIGA JR. V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p.429-38, 2002.
5. PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA JR., V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L. & ANTUNES, A.O.C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal Brazilian Chemical Society*, v.11, n.4, p.355-60, 2000.
6. CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, vol. 1-6, 1984.
7. LANGENHEIM, J.H. & FEIBERT, E.B. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry*, v.27, n.8, p.2527-32, 1988.
8. VEIGA JÚNIOR, V.F. & PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, v.25. n.2. p273-86, 2002.
9. OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A. & ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

10. LEVY, L. Carrageenan paw edema in mouse. *Lif. Sci.* 8 (I), pp. 601 – 606, 1969.
11. AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. & SANTOS, A. *BioEstat* 5. Sociedade Civil Mamirauá. MCT – CNPq, Belém, Pará, Brasil. 2008.
12. DI ROSA, M. & WILLOUGHBY, D.A. Screens of anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.23, n.4, p.297-8, 1971.
13. BARROS, F.E.V.; SOUSA, M.G.T; COSTA, J.L.; OLEA, R.S.G.; FREIRE, S.M.F; BORGES, A.C.R. & BORGES, M.O.R. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis Procera* R. BR. (Ciúme). *Infarma*, V.16, 9-10, 2004.
14. FARSAM, H.; BAREZI, S.; SOURI, E.; AMIN, G. & JALALIZADEH, H. Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia ultifida* DC. root extract. *J Ethnopharmacol*, 71:443-7. 2000.

Declarar:

Conflito de interesse: Não
Fonte de financiamento: Não

Correspondência:

José Wagner Cavalcante Muniz
Rua: Dos Pariquis, 1283 – Apart. 2101
Bairro: Batista Campos – Cep.: 66093-590 - Belém, PA - Brasil.
Telefone: (91) 4009-3166 e (91) 8824-0000.
wagnermuniz@superig.com.br

Recebido em 05.10.2009 – Aprovado em 28,01.2010