

EFEITO SUBAGUDO DE ALTAS DOSES DO ÓLEO DE COPAÍBA NOS NÍVEIS DE ENZIMAS HEPÁTICAS EM SORO DE RATOS¹

THE SUBACUTE EFFECT OF HIGH DOSES OF COPAIBA OIL IN THE LEVELS OF HEPATIC ENZYMES IN SERUM OF RATS¹

Nara Macedo BOTELHO², Rita de Kássia Vidigal CARVALHO³, Lia Tavares de Moura Brasil MATOS³, Rodolfo Costa LOBATO³ e Suelen Costa CORRÊA³

RESUMO

Objetivo: analisar o efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba em aminotransferases (AST – aspartato aminotransferase e ALT – alanina aminotransferase), fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase (gama GT), em ratos. **Método:** estudo experimental, no Laboratório de Cirurgia Experimental UEPA. Utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, distribuídos em três grupos de cinco ratos cada. Cada animal recebeu, via gavagem, a determinada dose de óleo de copaíba - *Copaifera officinalis* - ou água destilada, durante 14 dias, conforme: Grupo copaíba 6 (GCop6), 6,0 ml/kg de copaíba; Grupo copaíba 7,2 (GCop7), 7,2 ml/kg de copaíba; e Grupo Água (GC, 6,0 ml/kg de água destilada. Após o 14^o dia, foram retiradas amostras de sangue dos animais em que foram ensaiadas as enzimas hepáticas. **Resultados:** no GCop7, todos os animais morreram devido a alta dose de copaíba, que provocou ulceração e perfuração da parede gástrica. Dentre os outros dois grupos, os níveis séricos de AST e ALT mantiveram-se estáveis e normais, enquanto que os níveis de fosfatase alcalina e gama GT estavam, estatisticamente, elevados no GCop6 em relação à normalidade. **Conclusão:** o uso subagudo de copaíba em altas doses não altera os níveis séricos de AST e ALT; no entanto, essa mesma dosagem leva ao aumento no soro da fosfatase alcalina e da gama GT.

DESCRITORES: copaifera, ratos, transaminases, fosfatase alcalina, gama-glutamiltransferase.

INTRODUÇÃO

A Amazônia é a maior reserva do planeta em produtos naturais utilizados como fitoterápicos.¹

Mais, especificamente, nos estados do Pará e Amazonas, grande parte da população vem utilizando esses produtos naturais, principalmente, as plantas medicinais para o tratamento das mais diversas doenças. Os conhecimentos sobre os efeitos de plantas naturais são oriundos da herança cultural dos índios, que as utilizavam como terapêutica para reações inflamatórias agudas e crônicas.^{2, 3, 4}

Essa medicina natural vem sendo utilizada como alternativa para o tratamento de doenças pela população, não só pelo seu

poder curativo, mas, também, pelo seu custo reduzido. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que, por conta da pobreza e do bloqueio ao acesso à medicina moderna, 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam, essencialmente, das plantas medicinais como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde.⁵

Dentre as diversas plantas medicinais, uma das mais conhecidas e utilizadas é a copaíba - *Copaifera officinalis* - . Esta planta fornece um óleo de baixo custo e fácil acesso, o qual apresenta um poder terapêutico, cujas propriedades biológicas estão amplamente descritas na literatura.^{6,7,8,9,10}

¹ Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará UEPA

² Profª. Dra Adjunta do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará

³ Médicos graduados pela Universidade do Estado Pará UEPA

A população que faz uso desta planta como medicamento, afirma que a mesma apresenta ação antiinflamatória, analgésica, anestésica, cicatrizante, anti-séptica, anti-reumática e até anticancerígena, sendo que, algumas dessas propriedades já foram comprovadas cientificamente.^{1, 2, 9, 11}

Dentre essas ações comprovadas estão os potentes efeitos antiinflamatório, cicatrizante e analgésico do óleo de copaíba.^{6, 7, 8, 11, 12}

Outros efeitos benéficos do óleo de copaíba foram observados, como o efeito antitumoral^{13,14}, diurético^{15,16}, antiparasitário e antimicrobiano *in vitro*¹⁷, bem como o efeito repelente quando associado ao pólen.¹⁸

Assim, levando em consideração as diversas ações terapêuticas demonstradas em estudos com o óleo de copaíba, também, foram desenvolvidos estudos buscando avaliar as alterações hepáticas que podem acontecer devido ao uso de óleo de copaíba.¹⁹

Alguns trabalhos desenvolvidos utilizando óleo de copaíba mostraram que os níveis da AST, ALT, gama GT e fosfatase alcalina apresentaram-se mais baixos ou em níveis normais num grupo em que se utilizou copaíba, quando comparado com um grupo padrão no qual não se utilizou substância alguma.^{20, 21}

Há na literatura trabalhos que analisaram enzimas hepáticas em animais submetidos à isquemia e reperfusão hepática associado ao uso do óleo da copaíba, obtendo resultados que mostraram níveis normais das enzimas hepáticas naqueles animais aos quais foi administrado copaíba.²²

Portanto, ao se avaliar a eficácia do óleo de copaíba, a qual já é comprovada cientificamente, se observa que nas situações de utilização aguda (até sete dias) deste óleo medicinal não houve alterações hepáticas significativas. Isso demonstra que não ocorre lesão direta no fígado quando se utiliza o óleo de forma aguda. Entretanto, não se conhece a ação do óleo da copaíba nas enzimas hepáticas, quando a mesma for

utilizada por longos períodos (tempo maior que sete dias) e em altas doses, o que poderia causar hepatotoxicidade.

OBJETIVO

Analisar o efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba nos níveis de enzimas hepáticas em soro de ratos.

MÉTODO

• Ética e Lei

Os animais desta pesquisa foram cuidados segundo a legislação nacional para vivisseção animal em vigor (Lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Pará UEPA.

• Amostra

Foram utilizados 15 ratos - *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia* - da linhagem *Wistar*, machos, adultos, pesando de 250 a 300 g, provenientes do biotério do Instituto Evandro Chagas - IEC (Belém-Pará), adaptados ao biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental - LCE (UEPA) por um período de 15 dias antes do início do estudo. Durante o período do experimento os ratos foram mantidos em ambiente controlado (ciclo claro/escuro, de 12 horas cada, com iluminação de 50 lux, temperatura ambiente de 22°C, ruídos de no máximo 40 dB e umidade do ar de 55% ur – umidade relativa) com alimentação e água fornecidas *ad libitum*.

• Material vegetal

O óleo de copaíba utilizado foi da espécie *Copaifera officinalis*, sendo seu fornecimento e análise físico-química realizados pela empresa Beraca/Brasmazon – Indústria de Oleaginosas e Produtos da Amazônia (PA).

- **Grupos**

Para o experimento, os ratos foram distribuídos, randomicamente, em três grupos de cinco ratos cada. Cada grupo recebeu por gavagem uma dose diária de água ou óleo de copaíba por 14 dias, conforme o esquema a seguir:

- Grupo copaíba 6 (**GCop6**): 6,0 ml/kg de óleo de copaíba
- Grupo copaíba 7,2 (**GCop7**): 7,2 ml/kg de óleo de copaíba
- Grupo Água (**GC**): 6,0 ml/kg de água destilada.

- **Procedimentos**

- Administração do óleo de copaíba

Considerou-se como uso agudo do óleo de copaíba, sua administração até 7 dias e uso subagudo sua administração por 14 dias.

A experimentação consistiu na administração do óleo de copaíba e da água destilada durante 14 dias, via gavagem, de acordo com as doses de cada grupo citadas acima.

Logo após o 14^o dia, os ratos foram submetidos à anestesia por inalação de éter etílico, utilizando vaporizador artesanal; realizada punção cardíaca por meio de seringa de 10 ml acoplada à uma agulha 25 x 7 para a coleta de 5 ml de sangue. Posteriormente, a eutanásia foi realizada por meio de anestésico inalatório (éter etílico).

- Ensaio de atividade enzimática

As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio tipo Vacutainer SSA[®] e, posteriormente, submetidas à análise bioquímica das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (gama GT) e fosfatase alcalina (FALC). Para ensaio enzimático das amostras, foi utilizado o método “Automatizado”.

- Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados, estatisticamente, com o programa Bioestat 5.0, pelo teste t de Student, sendo adotados 0,05 ou 5% como índice para a rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

QUADRO 1– Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST)

	Grupo Copaíba 6	Grupo Controle
R1	266	119
R2	126	113
R3	127	91
R4	204	102
R5	88	113
Média	107.6000	162.2000
Variância	123.8000	5144.2000

FONTE: Protocolo de pesquisa
 $p < 0,05$ ($p=0.1678$) - Teste t de Student
 Valor de t: -1.6821.

QUADRO 2 – Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT)

	Grupo Copaíba 6	Grupo Controle
R1	90	167
R2	74	112
R3	98	62
R4	92	131
R5	169	101
Média	104.6000	114.6000
Variância	1374.8000	1493.3000

FONTE: Protocolo de pesquisa
 $P < 0,05$ ($p=0.6873$) - Teste t de Student
 Valor de t: -0.4175.

QUADRO 3 – Níveis séricos de fosfatase alcalina (FALC)

	Grupo Copaíba 6*	Grupo Controle
R1	301	10.92
R2	356	32.76
R3	493	50.96
R4	322	21.94
R5	441	23.66
Média	382.6000	28.0480
Variância	6659.3000	224.2733

FONTE: Protocolo de pesquisa
 $*p < 0,05$ ($p=0.0007$) - Teste t de Student
 Valor de t: 9.5556.

QUADRO 4 – Níveis séricos de gama glutamiltransferase (GammaGT)

	Grupo Copaíba 6*	Grupo Controle
R1	4	0.927
R2	5	1.391
R3	8	0.464
R4	5	0.464
R5	4	0.464
Média	5.2000	0.7420
Variância	2.7000	0.1718

FONTE: Protocolo de pesquisa

* $p < 0,05$ ($p=0.0042$) – Teste T-Student

Valor de t: 5.8823.

DISCUSSÃO

Durante a realização do estudo, todos os cinco animais do grupo Gcop7 morreram antes do 14^o dia, não completando todo o ciclo do trabalho. Suas mortes ocorreram na seguinte seqüência: dois animais morreram no 4^o dia e três animais morreram no 5^o dia, após o início da administração do óleo de copaíba. Durante os dias que estes animais permaneceram vivos, foram observadas hemorragias digestivas altas e baixas.

Depois de realizada necrópsia dos mesmos, concluiu-se que os animais desenvolveram ulceração gástrica e colônica, com hemorragia digestiva alta e baixa e posterior perfuração da parede gástrica e colônica. Conseqüentemente, evoluíram com hemorragia intra-abdominal e óbito. Provavelmente, isso se deve a associação do efeito corrosivo que o óleo da copaíba possui e da maior quantidade de óleo administrada a esse grupo.

Todos os outros 10 animais viveram até o 14^o dia do experimento, quando foi realizada eutanásia dos mesmos.

Quanto aos dados obtidos referentes às enzimas hepáticas AST e ALT, não foram observadas nenhuma alteração, estatisticamente, significativa nos animais em que se utilizou óleo de copaíba (Quadros 1 e 2). O mesmo resultado foi obtido por trabalhos desenvolvidos por Noguchi (2002)²⁰, Brito (2004)²¹, Araújo (2005)²² e

Brito (2004)²³. Esse achado, provavelmente, se deve ao fato de que a copaíba não se torna tóxica aos hepatócitos quando administrada por gavagem, mesmo em altas doses e por períodos prolongados.

Já em relação à fosfatase alcalina, estava bem mais elevada no grupo no qual foi feita administração de óleo de copaíba (**GCop6**) em comparação com o grupo no qual se administrou água destilada (**GC**) (Quadro 3). Esse aumento foi, estatisticamente, significativo, já que a fosfatase alcalina chegou a atingir, no grupo copaíba, 30 vezes mais que os níveis do grupo água destilada (níveis normais). Diferente resultado foi obtido em trabalho desenvolvido por Brito (2004)²¹, em que os níveis de fosfatase alcalina mantiveram-se normais.

Essa discordância entre os resultados deve ter ocorrido pela diferença do tempo de tratamento e das doses de óleo de copaíba administradas nos dois trabalhos. Neste ensaio experimental foi utilizada uma dose bem mais elevada (6,0 ml/kg) e por um período prolongado (14 dias), contrastando com a baixa dose (0,63 ml/kg) e curto período de indução (1 dia) da pesquisa desenvolvida por Brito (2004).²¹

Os níveis de atividade da enzima gama GT no grupo em que foi realizada administração do óleo de copaíba estavam até 16 vezes maiores que no grupo em que se administrou água destilada (Quadro 4). Resultado oposto ao deste estudo foi obtido em pesquisa desenvolvida por Noguchi (2002)²⁰ e Brito (2004)²¹, em que os autores encontraram dados sugestivos de que o óleo de copaíba seria um fator que diminuiria os níveis de gama GT, já que, em seus trabalhos, a dosagem dessa enzima no grupo copaíba era a metade do valor do grupo controle.

Essa divergência, semelhante à divergência encontrada com os níveis séricos de fosfatase alcalina, deve-se, provavelmente, ao prolongado período de administração e altas doses utilizadas neste

ensaio experimental, diferente do que ocorreu nos trabalhos citados anteriormente.

Sabe-se que a fosfatase alcalina e a gama GT elevadas de forma simultânea no soro são indicadoras de possível colestase no sistema ductal biliar. Assim, acredita-se que o óleo de copaíba administrado em altas doses e por períodos prolongados, no limiar da sobrevivência, pode levar à estase biliar.

copaíba não altera os níveis séricos de AST e ALT; no entanto, provoca aumento sérico da fosfatase alcalina e da gama GT. Conforme esses resultados, acredita-se que possa haver um possível efeito colestático do óleo de copaíba sobre as vias biliares, sendo necessários mais estudos para comprovação dessa hipótese.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, o óleo de copaíba na dose de 7,2 ml/kg leva a morte dos animais em curto período de tempo (até 5 dias). Já na dose de 6 ml/kg e em uso subagudo (14 dias), o óleo de

SUMMARY

THE SUBACUTE EFFECT OF HIGH DOSES OF COPAIBA OIL IN THE LEVELS OF HEPATIC ENZYMES IN SERUM OF RATS

Nara Macedo BOTELHO, Rita de Kássia Vidigal CARVALHO, Lia Tavares de Moura Brasil MATOS, Rodolfo Costa LOBATO e Suelen Costa CORRÊA

Objective: to evaluate the subacute effect of high doses of copaiba oil in the aminotransferases (ASAT – aspartate Aminotransferase and ALAT – alanine Aminotransferase), alkaline phosphatase and gamma-glutamyl-transferase (gamma GT). **Method:** 15 Wistar male rats (Rattus norvegicus albinus) were used, distributed in three groups of five rats each. Each group received, by way of gavage, a quantity of the adopted substance, during 14 days, according to the following division: Copaiba 6 Group (Cop6G): 6.0 ml/kg of copaiba oil; Copaiba 7.2 Group (Cop7G): 7.2 ml/kg of copaiba oil; and Water group – Standard group – (SG): 6.0 ml/kg of distilled water. **Results:** after the 14th day, blood samples were collected from the animals, in which hepatic enzymes were assayed. In the Cop7G, all the animals died due to the high doses of copaiba oil, which caused an ulceration and perforation on gastric and colonic walls. Between the other two groups, the serum levels of ASAT and ALAT remained stable and normal. However, the serum levels of alkaline phosphatase and gamma GT were statistically elevated in the Cop6G regarding normality. **Conclusions:** it was concluded that the subacute use of copaiba oil in high doses does not alter the serum levels of ASAT and ALAT. However, this same quantity of copaiba oil increased the alkaline phosphatase and the gamma GT serum levels.

KEYWORDS: copaifera, rats, transaminases, alkaline phosphatase.

REFERÊNCIAS

1. Veiga Júnior, VF; Maciel, MAM. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova. 2005; 28(3): 519-28.
2. Brito, MVH; Figueiredo, RC; Tavares, MLC. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. Revista Paraense de Medicina. 2006; 20(2): 17-24.
3. Westphal, FL; de Lima, LC; Guimarães, RA; de Souza, RFS; do Couto, SB; Nakajima, SR. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de crajiru e polivinilpirrolidona iodado (PVPI) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2007; 34(3): 170-6.
4. Gomes, NM; Rezende, CM; Fontes, SP; Matheus, ME; Fernandes, PD. Antinociceptive activity of amazonian Copaiba oils. Journal of Ethnopharmacology. 2007. 109(3): 486-92.
5. Akerele, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. HerbalGram. 1993; 28:13-9.
6. Basile, AC; Sertié, JÁ; Freitas, PC; Zanini, AC. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. Journal of Ethnopharmacology. 1988; 22(1): 101-9.
7. Brito, NMB; Simões, MJ; Pessoa, AF; Melo, MCF. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. Revista Paraense de Medicina. 1998; 12(1): 28-32.
8. Pennaforte, RJ. Estudo da atividade antiinflamatória de duas espécies de plantas amazônicas. Dissertação de Mestrado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2003; 70pp.
9. Francisco, SG. Uso do óleo de resina de copaíba (*Copaifera Officinalis* L) em inflamação ginecológica. Femina. 2005; 33(2): 89-93.
10. Veiga Júnior ,VF; Andrade Jr, MA; Ferraz, IDK; Christo, HB; Pinto, AC. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. Acta Amazônica. 2007; 37(1): 123-6.
11. Veiga Júnior, VF; Rosas, EC; Carvalho, MV; Henriques, MG; Pinto, AC. 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. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 112(2): 248-54.
12. Paiva, LAF; Gurgel, LA; Silva, RM; Tomé, AR; Gramosa, NV; Silveira, ER; Santos, FA; Rao, VSN. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. Vascular Pharmacology. 2003; 39: 303–7.
13. Desmarchelier, CJ; Bustamante, JM; Gil, RR; Coussio, JD; Ciccica, GN; Silva, GL. Profisetinidin type tannins responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*. Pharmazie. 2001; 56: 573-7.
14. Lima, SR; Junior, VF; Christo, HB; Pinto, AC; Fernandes, PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. Phytotherapy Research. 2003; 17(9): 1048-53.
15. Paiva, LAF; Gurgel, LA; De Sousa, ET; Silveira, ER; Silva, RM; Santos, FA et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 93(1): 51-6.
16. Tirapelli, CR; Ambrosio, SR; da Costa, FB; Coutinho, ST; de Oliveira, PC; Oliveira, AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. European Journal of Pharmacology. 2004; 492: 233–41.
17. Cotoras, M; Folch, C; Mendoza, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3-beta-hydroxy-kaurenoic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52: 2821–6.
18. Freire, DCB; Brito-Filha, CRC; Carvalho-Zilse, GA. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e Copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. Acta Amazônica. 2006; 36(3): 365-8.
19. Brito, MVH; Tavares, MLB; Moura, LGS; Lima, JT. Efeito do óleo de copaíba na função renal de ratos. Revista Paraense de Medicina. 2001; 15: 28-32.
20. Noguchi, A; Brito, MVH; dos Reis, JMC; Dias, CS; Epaminondas, WA; Azevedo, PSR. Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira. 2002; 17(2): 130-4.

21. Brito, MVH; Maneschy, RB; Albuquerque, BCM; Braz, MN; Rocha Neto, OG; Araújo Júnior, FA. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática. *Revista Paraense de Medicina*. 2004; 18(3):23-8.
22. Araújo, JFA; Braz, MN; Rocha Neto, OG; Costa, FD; Brito, MVH. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005; 20(1): 93-9.
23. Brito, MVH; Vasconcelos, DM; Costa, FD; Tavares, MLC; Muto, NS; Dolabela, MF; Teixeira, RR. Avaliação da Toxicidade Aguda do óleo de copaíba em ratos. In: XII Congresso Médico-Amazonico, 2004, Belém. *Revista Pará-Médico*. Volume 8 (1) Mar/2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Rodolfo Costa Lobato
Rua Domingos Marreiros, 645/500 – Umarizal
60055-210 Belém PA
8835-8938/ 3241-9595
rodolfolobato49@yahoo.com.br

Recebido em 20.10.2010 - Aprovado em 19.08.2011