

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA OLEORRESINA DE COPAÍBA (*COPAIFERA RETICULATA DUCKE*) *IN NATURA* E EM POMADA NA PELE DE RATAS WISTARS

*EVALUATION OF THE TOXICITY OF COPAIBA OLEORESIN (*COPAIFERA RETICULATA DUCKE*) *IN NATURA* AND OINTMENT IN THE SKIN OF WISTARS RATS*

Kamila Lima de Souza¹, Adriana Caroprezo Morini², Elaine Cristina Pacheco de Oliveira¹, Josiane Elizabeth Almeida e Silva³, Antônia Irisley da Silva Blandes¹, Lucas Nathan Rodrigues Silva¹, Iasmin Laís Damasceno Paranatinga¹, Taiara de Andrade Picanço¹

¹Universidade Federal do Oeste do Pará. ²Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. ³Universidade Federal do Amazonas. k_mila_lima@hotmail.com

RESUMO

A utilização das plantas medicinais sem cautela e acompanhamento podem provocar reações de causas intrínsecas e extrínsecas. Pesquisas voltadas para a utilização segura de plantas medicinais ainda são escassas, por isso, o objetivo deste trabalho é a avaliação da toxicidade dérmica da oleoresina de copaíba, um dos principais recursos naturais utilizado para diversos fins terapêuticos pela comunidade tradicional. Para verificar a toxicidade dérmica da pomada de *C. reticulata* Ducke foram utilizadas as recomendações do protocolo *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) 404/2015, tanto na forma *in natura*, quanto em pomada a 10%, em uma única aplicação e durante 14 dias no dorso de ratos wistar. Após o teste, foi possível verificar que o uso *in natura* da oleoresina de *C. reticulata* Ducke pode provocar efeitos irritantes/corrosivos, diferentemente de sua formulação em pomada.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas Medicinais, Uso Terapêutico, Testes de Irritação da Pele

ABSTRACT

The use of medicinal plants without caution and monitoring can cause reactions of intrinsic and extrinsic causes. Research aimed at the safe use of medicinal plants is still scarce, therefore, the objective of this work is to evaluate the dermal toxicity of oleoresin from copaiba, one of the main natural resources used for various therapeutic purposes by the traditional community. To verify the dermal toxicity of *C. reticulata* Ducke ointment, the recommendations of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 404/2015 protocol were used, both in natura form and as a 10% ointment, in a single application and during 14 days on the back of wistar rats. After the test, it was possible to verify that the use

of *C. reticulata* Ducke oleoresin in natura can cause irritating/corrosive effects, differently from its ointment formulation.

KEYWORDS: Medicinal Plants, Therapeutic Uses, Skin Irritancy Tests

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um terço da flora mundial, comportando a maior reserva de produtos naturais do planeta. A crença popular brasileira, muito forte em benzedeiras e curandeiras, transmitida de geração em geração, preservou a utilização de plantas medicinais no país, especialmente nas áreas mais afastadas do centro urbano, e na região amazônica¹.

Pertencentes à família *Fabaceae*, subfamília *Detarioideae*, gênero *Copaifera*, as copaibeiras são árvores encontradas na Amazônia e responsáveis pela produção de uma oleoresina, um dos recursos naturais mais utilizados pela comunidade tradicional. Extraída do tronco da árvore, a oleoresina de copaíba é composta por duas partes, uma resina líquida dita de diterpenos e uma fração volátil, chamada de sesquiterpenos, que pelo sinergismo de seus componentes possuem propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antiedematosas, antifúngica e cicatrizante sendo bastante utilizada para fins terapêuticos^{2,3}.

Apesar de sua indicação para diversas finalidades, o uso de produtos naturais não é totalmente seguro e eficaz. Sabe-se que diversas plantas usadas com finalidade medicinal demonstram um potencial risco tóxico decorrente da presença de substâncias agressivas. Inúmeros produtos, no Brasil, são comercializados em mercados e feiras de forma livre, comumente sem regulamentação ou fiscalização^{1,4}.

A utilização das plantas medicinais sem cautela e acompanhamento podem provocar reações de causas intrínsecas e extrínsecas, sendo as primeiras: overdose, toxicidade, interação medicamentosa e alergias; e as outras: contaminação, adulteração, preparo e estocagem de maneira errada⁵.

Pesquisas voltadas para a utilização segura de plantas medicinais ainda são escassas, por isso, o objetivo deste trabalho é a avaliação da toxicidade dérmica da oleorresina de copaíba *in natura* e em pomada.

METODOLOGIA

A oleorresina da *Copaifera reticulata* Ducke foi coletada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no município de Belterra-PA, no km 117 da rodovia BR-163, no mês de setembro de 2016, durante o período seco, de copaibeiras identificadas e georreferenciadas. Em parcerias com o Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), a amostra foi caracterizada e realizada a identificação de seus componentes químicos.

A oleorresina foi manipulada para uma formulação em pomada *C. reticulata* a 10%. Esta concentração foi escolhida baseado com o protocolo preconizado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira⁶.

Para verificar a toxicidade dérmica da pomada de *C. reticulata* Ducke foram utilizadas as recomendações do protocolo *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) 404/2015⁷, que busca avaliar a irritação e corrosão da pele após a aplicação única de uma substância. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará com o protocolo Nº 0220200089.

Para este experimento foram utilizadas 8 ratas *wistar*, fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas, peso variando entre 200 e 250g. Todos os animais foram colocados em gaiolas isoladas e então submetidos à anestesia, logo após, foram colocados em decúbito ventral, e então realizada a tricotomia de 6 cm² na região dorsal dos ratos em dois locais, 24 horas antes de aplicar a oleorresina da copaíba, em duas formas, pura e pomada de *C. reticulata* Ducke a 10%, na dose de 0,5ml por animal. A região superior tricotomizada foi utilizada como controle, não

havendo aplicação de nenhuma substância, e na região inferior houve aplicação da substância a ser testada.

De acordo com o protocolo do teste, foram formados com apenas um animal grupos experimentais, para a realização da única aplicação das substâncias e ainda, uma adaptação, alterando a quantidade de dias, com grupos experimentais de aplicação com doses repetidas durante 14 dias. Após a aplicação o local foi recoberto por gaze e fita não irritativa. Depois de 4 horas a área foi limpa e toda substância retirada com auxílio de soro fisiológico e gaze. Se, durante esse período, fosse identificado alguma reação sofrimento ou dor excessiva ao animal, o teste seria imediatamente finalizado. Caso não fosse verificado qualquer sinal de corrosão da pele, se realizaria com mais 3 ratos, o teste de confirmação. A primeira avaliação do aspecto da pele ocorreu logo após a limpeza da área, e então, depois de 1, 24, 48 e 72 horas.

A avaliação dos resultados ocorreu de acordo com a classificação pré-determinada pelo protocolo, em que se verifica a formação de eritema e escaras e ainda de edema de 0 à 4, sendo 0 sem a formação dos mesmos, 1 leve, 2 bem definido, 3 moderado e 4 grave. Posteriormente, foi calculada a média dos valores ganhos e a obtenção da classificação da substância em: não-irritante (0,0-1,0), irritante moderado (1,1-2,0), irritante grave (2,1-3,0) e corrosivo (3,1-4,0).

Ao final, caso a aplicação da oleoresina e/ou da pomada provocar lesões na pele dos animais que sejam reversíveis, a mesma seria considerada como substância que produz irritação dérmica. No entanto, se provocasse danos na pele como úlceras, hemorragia e necrose visível através da epiderme e na derme, classificados como irreversíveis, ela seria considerada corrosiva.

RESULTADOS

Após o período de 24 horas da tricotomia realizada no dorso dos animais, não ocorreu qualquer sinal de irritação na pele das fêmeas, não havendo a necessidade de troca das mesmas.

Na realização do teste de única aplicação, o dorso dos animais foi observado de forma diária até 72 horas, após a aplicação da oleorresina *in natura* e em pomada a 10%. Na tabela 1, pode-se verificar que todos os animais foram classificados em grau 0, uma vez que não houve a formação de eritema/escaras ou de edema. Em seguida, o teste de confirmação demonstrou o mesmo resultado, quando realizados em mais três animais, além de não apresentarem alterações no comportamento ou alimentação. O que também não ocorreu nos estudos de Lima⁸ ao utilizar a *C. paupera* e Morini et al.⁹ com *C. duckei*, ambos realizaram o teste com a substância *in natura* e em gel a 10%.

Tabela 1. Resultado da toxicidade dérmica com teste de uma única aplicação (n=8).

Animais	<i>C. reticulata</i> Ducke <i>in natura</i>		Pomada de <i>C. reticulata</i> Ducke a 10%	
	Eritema/Escaras	Edema	Eritema/Escaras	Edema
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
Teste de Confirmação				
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0

Logo após, foi realizada uma adaptação do teste, com aplicação em doses repetidas diariamente, durante 14 dias, e se observou que os animais em que se utilizou a *C. reticulata* em pomada a 10%, incluindo os do teste de confirmação, não apresentaram sinal de eritema/escara ou edema, classificados em grau 0 (Tabela 2). O que também foi descrito por Estevão et al.¹⁰ que não encontraram qualquer sinal de irritação ou alergia no local de aplicação, ao utilizar a oleorresina de *C. langsdorffii* em pomada na mesma concentração desse estudo, durante 8 dias. Assim como o uso em concentração menor a 2,5% como creme vaginal em ratas gestantes⁴. E em outro estudo realizado, Lima¹¹, verificou que o uso da oleorresina *C. duckei* (28mg/kg) como creme vaginal não apresentou sinal de irritação em sua aplicação na mucosa por 22 dias.

A Tabela 2 mostra ainda, que a aplicação continuada da *C. reticulata in natura*, gerou um grau 3 de eritema/escaras e grau 1 de edema, e ao se realizar o teste de confirmação houve diferentes graus de eritema/escaras, chegando até grau 3, mas mantendo grau 1 de edema em dois animais. Corroborando com Lima⁸, que apesar de não apresentarem qualquer grau de edema, os animais da pesquisa tiveram formação de eritema/escaras, com grau 2, na aplicação diária durante 6 dias da oleorresina de *C. paupera in natura*.

Já Carvalho et al.¹², ao realizarem por 7 dias a aplicação da *C. duckei* em sua forma pura não obtiveram sinais de irritação ou processo inflamatório na região dorsal dos animais. O que também não ocorreu no estudo de Brito et al.¹³ ao utilizar a oleorresina de *C. officinalis*, sob a pata traseira dos ratos, por 14 dias. Assim como a aplicação do óleo de *C. multijuga* puro, em diferentes dosagens, por Gonçalves et al.¹⁴ através da via oral, não demonstrou toxicidade no sistema reprodutor masculino dos animais.

Durante o uso contínuo das substâncias, verificou-se que no quinto dia de aplicação, todos os animais já apresentavam grau 1 de eritema/escaras, igualmente descrito por Lima⁸, que no mesmo dia observou um processo bem delimitado de hiperemia e pequenos locais de descontinuidade da pele, este último, ocorrendo no estudo presente, apenas mais a frente, a partir do oitavo dia.

Além disso, foi possível verificar um efeito estressor da aplicação da oleorresina, que fez com que as ratas deixassem de se alimentar corretamente, provocando durante o experimento oscilação de humor, tornando-as mais agitadas e agressivas. Em discordância do encontrado por Gonçalves et al.¹⁴, que seus animais apresentaram ganho de massa, aumento do consumo de água e não tiveram alteração de comportamento.

Tabela 2. Resultado da toxicidade dérmica com teste adaptado para doses repetidas (n=8).

Animais	<i>C. reticulata</i> Ducke <i>in natura</i>		Pomada de <i>C. reticulata</i> Ducke a 10%	
	Eritema/Escaras	Edema	Eritema/Escaras	Edema
1	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0
Teste de Confirmação				
1	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0
2	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0

As diferenças encontradas entre os estudos realizados com a oleorresina *in natura*, ou como pomada, podem ser consequência do perfil oleoso que a substância possui, podendo impedir sua absorção e distribuição por camadas mais internas do tecido, em junção com o fato de ao ser utilizada pura está mais concentrada. E ainda, a oleorresina é formada por duas frações, uma volátil e uma resinosa, sendo esta última dita como irritante tanto para mucosas quanto para a pele. Uma elevada taxa de diterpenos, metabólitos da fração resinosa, podem provocar em algumas espécies uma resposta irritativa maior, explicando o fato de algumas apresentarem reações à aplicação *in natura*^{15,16}.

Tabela 3. Resultado da média da toxicidade dérmica com doses repetidas.

Grupos	Eritema/	escaras	Edema
	Média		
Oleorresina <i>in natura</i>		1,8	
Pomada a 10%		0	

Ao calcular a média geral dos dados obtidos (Tabela 3) e considerando a metodologia adotada e os resultados obtidos, a oleorresina na forma *in natura* foi classificada como irritante moderada, mas não corrosiva, já que as feridas ocasionadas em decorrência do seu uso contínuo foram reversíveis após a interrupção da sua aplicação.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a utilização da oleorresina de *C. reticulata* Ducke em pomada a 10% é segura e não irritativa/corrosiva à aplicação dérmica, mas o seu uso *in natura* pode provocar tais efeitos.

Outros estudos devem ser realizados em busca da identificação do componente químico que pode ser o provocador dos efeitos causados no uso puro da oleorresina, além de reproduzir o teste em novas espécies do óleo de copaíba ou períodos de coleta distintos, já que o estudo utilizou-se apenas de uma, e as mesmas apresentam diferença quanto à localização e sazonalidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Oeste do Pará, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, ao CAPES e todos que contribuíram com esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Santana RS, Bianchini-Pontuschka R, Hurtado FB, Oliveira CA, Melo LPR, Santos GJ. Uso medicinal do óleo de copaiba (*Copaifera* sp.) por pessoas de melhor idade no Município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. Acta Agronomica, v.63, n.4, 2014. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/48932>.
2. Azani N, Babineau M, Bailey CD, Banks HI. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxon. v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017. <https://doi.org/10.12705/661.3>.
3. Barquete CC, Oliveira RS, Neves EC, Pelizzari C, Santos JF, Souza RG, Caleffo T, Viott AM, Laskoski LM, Souza AF. Copaiba oil-resin (*Copaifera langsdorffii* Desf.: Caesalpiniaceae) associated with laser therapy for skin wound treatment in Wistar rats. Acta Veterinaria Brasilica December, 15, 304-309, 2021. <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2021.15.4.10017>.
4. Lima CS, Medeiros BJ, Favacho HA, Santos KC, Oliveira BR, Taglialegna JC, Costa EV, Campos KJ, Carvalho JC. Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). Phytomedicine. 18, 1013–1023, 2011. doi: 10.1016/j.phymed.2011.05.004.

5. Ferreira AD, Rocha CP, Vieira LM, Dusse LMS, Junqueira DRG, Carvalho MG. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. Rev. Bras. Farm. v. 94, n. 2, p. 94-101, 2013. https://www.inesul.edu.br/atividades/arquivos/Material1_1462485211.pdf.
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/1a-edicao-revogada>.
7. OECD (Organization for economic co-operation and development). Guideline for testing of chemicals: 404 - acute dermal irritation/corrosion, 2015. <https://doi.org/10.1787/9789264242678-en>.
8. Lima, HS. Potencial anti-inflamatório da oleoresina de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer – Leguminosae. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal do Oeste do Pará, 2015.
9. Morini AC, Marinho DF, Araujo JAS. Avaliação da ação terapêutica de *Copaifera duckei* Dwyer em uso tópico por fonoforese. Archives of veterinary science, v.21, p. 59-63, 2016.
10. Estevão LRM, Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratella-Evêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG da, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 44, n. 4, p. 406-412, abr. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000400011>.
11. Lima CS, Silva UDA, Goes LDM, Hyacienth MS, Carvalho HO, Fernandes CP, Castro NA, Carvalho JCT. Non-clinical toxicity study of the oil-resin and vaginal cream of *Copaiba* (*Copaifera duckei*, Dwyer). Cogent Biology, v.13, p. 1-33, 2017. <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1394510>.
12. Carvalho, JCT. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. Phytother. Rev. v. 19, p. 946 – 950, 2005. <https://doi.org/10.1002/ptr.1762>.
13. Brito MVH, Figueiredo RC, Tavares MLC, Silveira TS, Cantanhêde G. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos / Andiroba and copaiba oils effect in induced miositis in rats. Rev. para. med ; 20(2): 17-24, abr.- jun. 2006.

14. Gonçalves ES, Silva JR, Gomes CL, Nery MBL. Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil on reproductive performance of male Wistar rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 24, n. 3, p. 355-362, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.014>.
15. Giesbrecht PCP. Efeito da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro Universitário Vila Velha, 2011.
16. Costa AS, Lameira OA. Phytochemical study of oleoresin extracted from *Copaifera reticulata* Ducke (*Leguminosae-Caesalpiniodeae*) in a sustainable management area. Research, Society and Development, v.10, n.16, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.22305>.