

UVV - CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITOS DA POMADA DE ÓLEO DE COPAÍBA EM
QUEIMADURA CUTÂNEA EM RATO**

Patricia Caldeira Penna Giesbrecht

VILA VELHA – ESPIRITO SANTO

Fevereiro de 2011

UVV - CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA

**EFEITOS DA POMADA DE ÓLEO DE COPAÍBA EM
QUEIMADURA CUTÂNEA EM RATO**

Patrícia Caldeira Penna Giesbrecht

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Ricardo Cuña de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência Animal do Centro Universitário Vila Velha, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

VILA VELHA – ES

Fevereiro de 2011

UVV – CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato

Autora: Patrícia Caldeira Penna Giesbrecht

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Ricardo Cuña de Souza

**APROVADO como parte das exigências do Programa de Mestrado em Ciência Animal
para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL**

Vila Velha, 28 de fevereiro de 2011.

Banca examinadora

Prof. Dr. Vinícius Ricardo Cuña de Souza _____

Prof. Dra. Bethânia Souza Monteiro _____

Prof. Dra. Flávia Almeida Lucas _____

“O mestre não é aquele que sempre ensina, mas quem de repente aprende”.

Guimarães Rosa.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais *Abel* e *Geralda*.

Pai, minhas conquistas são tuas, meu caminhar foi edificado por seu exemplo de trabalho, honestidade e respeito.

Mãe, pessoa maravilhosa, me ensinou a amar e valorizar as pequenas grandezas da vida. Doce, cheia de amor e sabedoria, me conforta com seu exemplo de fé nos momentos difíceis. Você faz muita diferença na vida das pessoas que a cerca.

Ao meu marido *Eduardo*. Obrigada pela paciência, companheirismo, carinho, incentivo e otimismo nas adversidades. Amo você.

Aos meus filhos *Gustavo* e *Luiza* pela compreensão e motivação. A alegria de vocês me enche de energia e vida. Por vocês eu faço tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Vinícius Ricardo Cuña de Souza* que aceitou me orientar, mesmo sabendo que seria um grande desafio. Agradeço sua prontidão em me ajudar no experimento e seu otimismo que me fazia acreditar que tudo daria certo.

Ao *Prof. Dr. Ary Gomes da Silva* por sua generosidade ao ceder a pomada teste, fundamental ao experimento. Sou grata por seus ensinamentos baseados no rigor científico. Grande figura humana, grande mestre.

Ao *Prof. Alan Kardec Filho* por sua gentileza, paciência e enorme colaboração na leitura das lâminas do experimento.

Ao *Prof. Dr. Tadeu Uggere* sua atenção e incentivo foram essenciais para o início desta trajetória.

A *Prof. Dr^a. Clarisse Simões Coelho* pela colaboração na confecção da dissertação.

Aos *responsáveis pela mantenedora do Centro Universitário Vila Velha* pelo apoio financeiro e coragem de empreender possibilitando meu crescimento profissional.

Aos funcionários do biotério do Centro Universitário Vila Velha, *Ildomar Júnior Lourenço e Claudia Macaúba Santos*, sempre prestativos e dedicados no cuidado com os animais. A ajuda de vocês foi muito importante.

Ao funcionário do laboratório de patologia veterinária, *Carlos Roberto Marcos* pela confecção das lâminas da biópsia.

Aos *colegas e professores do mestrado* pela troca de conhecimentos, apoio nos seminários, convivência alegre e agradável.

A amiga **Regina Mamede** por sua companhia nos estudos e nos momentos de incerteza. Esta trajetória seria árdua sem sua presença.

A minha querida sogra *Valéria* pela atenção e carinho com meus filhos na minha ausência. Apoio fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

Á **DEUS**, presença constante em minha vida colocando em meu caminho pessoas maravilhosas.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice I:	Área da queimadura (mm ²) do grupo controle ao longo do experimento.....	52
Apêndice II:	Área da queimadura (mm ²) do grupo placebo ao longo do experimento.....	53
Apêndice III	Área da queimadura (mm ²) do grupo óleo de copaíba ao longo do experimento.....	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo A:	Logaritmo da área da queimadura do grupo controle ao longo do experimento	
Anexo B:	Logaritmo da área da queimadura do grupo placebo ao longo do experimento.....	53
Anexo C:	Logaritmo da área da queimadura do grupo óleo de copaíba ao longo do experimento.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Barra de metal com área de $3,8\text{cm}^2$ e peso de 200 g. Fonte: foto do experimento	23
Figura 2:	Mensuração dos diâmetros da lesão com paquímetro. Fonte: fotos do experimento.....	25
Figura 3:	Esquema das áreas definidas para biópsia da lesão.....	26
Figura 4:	Cromatograma em fase gasosa dos componentes do óleo essencial de <i>Copaifera langsdoffii</i> , evidenciando as moléculas dos compostos majoritários.....	29
Figura 5:	Crosta no 14º dia no animal do grupo controle (A), placebo (B) e tratado com pomada de óleo de copaíba (C).....	31
Figura 6:	Diagrama de regressão linear para a evolução do logaritmo das áreas (LAREA) das feridas originadas por queimaduras, ao longo de 30 dias de tratamento dos grupos estudados. A: controle; B: placebo; C: teste.....	32
Figura 7:	Animal do grupo controle dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E)..	32
Figura 8:	Animal do grupo placebo dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E)..	33
Figura 9:	Animal do grupo óleo de copaíba nos dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E)	33
Figura 10:	Valor médio e desvio padrão do percentual de contração no 3º, 7º, 14º e 21º dias de evolução da cicatrização das queimaduras nos grupos controle (GC), placebo (GP) e tratado com pomada de óleo de copaíba (GOC)	36
Figura 11:	Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos das biópsia da queimadura do animal do grupo controle no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras (imagem negativa do edema), seta verde imagens de tecido gorduroso e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B)	

	Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) setas azuis e imagens brancas das áreas de edema setas pretas. Aumento 40 x.....	37
Figura 12:	Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos das biópsia da queimadura do animal do grupo placebo no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras colágenas (imagem negativa do edema) e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B) Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares em setas azuis e imagens brancas das áreas de edema seta preta. Aumento 4 x.....	38
Figura 13:	Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos da biópsia da queimadura do animal do grupo copaíba no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras (imagem negativa do edema), seta verde imagens da crosta descamando e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B) Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (seta azul), neoformação vascular (seta preta) e fibroblastos (seta verde). Aumento 40 x.....	38
Figura 14:	Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos das biópsias das queimaduras do animal do grupo controle no 7º dia do experimento. (A) Imagem de epiderme necrótica descamando (crosta). Aumento 40 x. (B) Presença de vasos neoformados (corte longitudinal).Setas pretas evidenciando hemácias. Aumento de 40 x.	39
Figura 15:	Imagem fotográfica digital ilustrando corte histológico da biópsia da queimadura do animal do grupo copaíba no 7º dia do experimento evidenciando o alinhamento dos fibroblastos. Aumento 40 x.....	39
Figura 16:	Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos das biópsias das queimaduras dos animais dos grupos controle (A), placebo (B) e copaíba (C) no 21º dia do experimento. (A) Epiderme em fase final de regeneração com pequena área de lesão. (B) Epiderme com regeneração pronunciada aproximando as bordas.(C) Imagem de epiderme regenerada, revascularização e ausência de anexos. Aumento de 40 x.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Componentes majoritários do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> , identificados após separação em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Comparação dos espectros de massa obtidos na biblioteca espectral e dos Índices Aritmético e de Kovats calculados com os disponíveis em Adams.....	30
Tabela 2:	Classificação do edema nas lesões dos 3 grupos, no 3º dia	31
Tabela 3:	Parâmetros estimados para a regressão linear simples da cicatrização da queimadura submetida aos tratamentos com solução salina, solução salina + pomada placebo e solução salina + pomada de óleo de copaíba a 1,0% (OC-1,0%).....	34
Tabela 4:	Diferenças entre os ângulos das retas estimadas para a evolução da área das feridas induzidas por queimadura na pele de ratas <i>Wistar</i> , em função da exposição por 30 dias aos tratamentos dos grupos controle, placebo e teste, verificado pelo Teste de Tuckey.....	35
Tabela 5:	Percentual médio e desvio padrão da contração da ferida dos grupos controle (GC), placebo (GP) e óleo de copaíba (GOC)	35

SUMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Queimadura	17
2.2. Óleo de Copaíba	19
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Animais	22
4.2. Procedimentos	22
4.2.1. Indução das queimaduras.....	22
4.2.2. Obtenção e purificação do óleo essencial.....	23
4.2.3. Análises cromatográficas	23
4.2.4. Preparação das pomadas	24
4.2.5. Acompanhamento das lesões	24
4.2.6. Avaliação histológica	26
4.3. Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Densidade e perfil fitoquímico do óleo essencial de copaíba	28
5.2. Avaliação clínica dos animais	29
5.3. Avaliação macroscópica das queimaduras	30
5.4. Avaliação microscópica das queimaduras	35
6. DISCUSSÃO	40
6.1. O óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> Dess	40
6.2. A cicatrização das feridas induzidas por queimaduras	41
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICES	54
ANEXOS	58

GIESBRECHT PCP Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato. [Dissertação de Mestrado]. Vila Velha-ES: Pós-Graduação em Ciência Animal, UVV – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

RESUMO

O processo de reparação cutânea após queimadura constitui um complexo mecanismo em que fatores como infecção, edema e inflamação prolongada contribuem para criação de cicatrizes hipertróficas, por vezes limitantes. Acidentes com animais domésticos envolvendo agentes causadores de queimadura tornaram-se rotina no consultório veterinário. Muitos recebem o primeiro atendimento com produtos de conhecimento popular para cicatrização, a maioria sem fundamentação científica. Este estudo pretende avaliar macro e microscopicamente os efeitos da pomada de óleo essencial de copaíba a 1% na cicatrização de queimadura cutânea induzida por metal aquecido. Para tal, foram utilizados 31 ratos *Wistar*, idade média de 223 dias, sete animais para biópsia de pele íntegra (dia 0) e o restante dividido em três grupos submetidos aos respectivos tratamentos: grupo controle, com higiene com solução salina; grupo placebo, tratado com pomada base sem princípio ativo e grupo óleo de copaíba (pomada de óleo essencial de copaíba a 1%). Acompanhados diariamente por um período de 30 dias, as características macroscópicas e fragmentos para histopatologia foram coletados nos dias 3, 7, 14 e 21 pós queimadura. O modelo linear estimado explicou 86,7% da variação das áreas do grupo controle, 91% do placebo e 89,6% copaíba. Todos os grupos tiveram retas altamente significativas ($p = 0,0$) com ângulos diferentes de zero e coeficientes angulares negativos (controle = -0,933; placebo = -0,954 e copaíba = -0,947) demonstrando que todas as feridas reduziram. Comparando o ângulo da reta do grupo pomada-teste com os outros percebe-se que seu valor foi maior e altamente significativo. Na avaliação macroscópica foi observada a ação anti-edematosa da pomada de óleo de copaíba a 1% na fase inflamatória aguda e redução significativa no tempo de cicatrização total ($p = 0,01$). A avaliação microscópica demonstrou maior angiogênese, melhor organização das fibras colágenas e menor dissociação destas (menor edema) no grupo pomada-teste. Concluiu-se que a pomada de óleo essencial de copaíba a 1% acelera a cicatrização de queimaduras em ratos.

Palavras chave: cicatrização, *Copaifera*, óleo de copaíba, queimadura, ratos

GIESBRECHT PCP Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato. [Dissertação de Mestrado]. Vila Velha-ES: Pós-Graduação em Ciência Animal, UVV – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

ABSTRACT

The repair process after a cutaneous burn is a complex mechanism in which factors such as infection, prolonged swelling and inflammation contribute to the development of hypertrophic scars, sometimes limiting function. Accidents involving domestic animals with products that cause burns have become routine in veterinary practice. Many of them are treated with products used in the popular medicine, most without scientific foundation. This study aims to evaluate macro and microscopically effects of the 1% ointment of Copaiba essential oil on the healing process of heated metal burn-induced skin. To this end, we used 31 Wistar rats, mean age 223 days, seven animals for biopsy of healthy skin (day 0) and the rest divided into three groups submitted to the respective treatments: control group, treated with saline hygiene; placebo group, treated with ointment base without the active group, and Copaiba oil, treated with 1% ointment of Copaiba essential oil. Animals were monitored daily for a period of 30 days. Macroscopic features and fragments for histopathological analysis were obtained on days 3, 7, 14 and 21 post burn. The estimated linear model explained 86.7% of response areas in the control group, 91% for placebo and 89.6% for Copaiba. All the groups had straight highly significant ($p = 0.0$) with different angles of zero and negative slopes (control = -0.933; placebo = -0.954 and -0.947 = Copaiba) showing that all the wounds reduced size. Comparing the angle of straight-ointment group test with the others demonstrated that its value was greater and highly significant. In the macroscopic evaluation the anti-edematous action of 1% ointment of Copaiba oil in the acute inflammatory phase and a significantly reducing time for the complete healing ($p = 0.01$). Microscopic evaluation showed increased angiogenesis, better organization of collagen fibers and less dissociation of these (less swelling) in the ointment-test. It was concluded that the 1% ointment of Copaiba essential accelerates the healing of burns in rats.

Key-words: healing, Copaifera, copaiba oil, burn, rats.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil não há dados estatísticos oficiais sobre o número de acidentes por queimadura envolvendo animais. No entanto, o aumento da criação doméstica tem elevado a procura por atendimento clínico a estas ocorrências. Clínicos veterinários geralmente se defrontam com leigos medicando ferimentos de animais com substâncias nem sempre com ação conhecida ou comprovada¹.

Nos Estados Unidos ocorre um milhão de casos de queimadura a cada ano em humanos, dos quais cinco mil evoluem para óbito, sendo a quarta causa de morte não intencional².

Queimaduras são feridas traumáticas causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. O grau e a gravidade variam de acordo com a intensidade do agente ou fonte, tempo de exposição, profundidade da lesão, localização corpórea e condições nutricionais do paciente^{3,4}.

A cicatrização é um processo complexo. As falhas mais importantes nesse processo ocorrem nos primeiros estágios, produzindo edema acentuado, reduzindo a proliferação vascular e diminuindo os elementos celulares, como leucócitos, macrófagos e fibroblastos⁵.

Em lesões cutâneas por queimadura, a extensão da perda tecidual dificulta ou mesmo impossibilita a aproximação das bordas, e ocorre cicatrização por segunda intenção, que é um processo lento, com alto risco de infecção, produzindo retração cicatricial, cicatrizes extensas e alto custo de tratamento⁶.

O tratamento local ideal para a lesão é aquele que, ao mesmo tempo, controla o crescimento bacteriano, remove o tecido desvitalizado e estimula o crescimento dos queratinócitos^{7,8}. É universalmente aceito que o tópico mais eficaz para o controle da infecção local é a sulfadiazina de prata, mas os testes *in vitro* têm demonstrado que a prata inibe o crescimento dos queratinócitos⁹.

Embora já existam produtos contendo fatores de crescimento que vão reduzir metade do tempo para ocorrer a epitelização, ainda não são amplamente difundidos no mercado pelo seu elevado custo⁸.

O reparo de uma extensa lesão de queimadura tem sido um grande problema. Os estudos que abordam este tema têm como principais objetivos o desenvolvimento de tratamentos medicamentosos, de baixo custo visando promover um rápido reparo da área injuriada. Os enxertos de pele natural ou sintética e coberturas com tampões medicamentosos

a base de prata, sulfonamidas, cério e clorexidina têm sido os mais utilizados, gerando alto custo econômico¹⁰.

Vários estudos têm buscado alternativas terapêuticas como: ácido hialurônico¹¹, laserterapia^{12,13}, hidrogel à base de óleo de *Melaleuca alternifolia* Chell (Myrtaceae)¹⁴, membranas biológicas¹⁵, acupuntura¹⁶ entre outros, para incentivar o processo de cicatrização de queimaduras e minimizar as sequelas.

A fitoterapia tem sido amplamente investigada como um recurso terapêutico no auxílio da cicatrização de feridas cutâneas em animais. Cita-se o uso óleo de semente de girassol¹⁷, de *Calendula officinallis* L. (Asteraceae)¹⁸, do extrato de *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae)¹⁹ e da pomada à base de sementes de jaqueira, *Artocarpus heterophylla* Lam.(Moraceae)²⁰. Porém são escassos os estudos específicos em queimaduras.

O Brasil é um viveiro inesgotável de plantas medicinais e de grande aceitação pela população, entretanto, muitas destas não possuem comprovação científica de sua eficácia. Estudos estão sendo realizados, baseados na medicina popular, para avaliar as propriedades antiinflamatória, analgésica e cicatrizante do óleo de copaíba^{21,22}.

Os estudos sobre a atividade cicatrizante do óleo de copaíba tem se concentrado na fase resinosa, devido à presença de diterpenos, com propriedade comprovada cientificamente²³ apesar de não se conhecer ao certo seu mecanismo de ação²⁴.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queimadura

Nos países desenvolvidos, a taxa de queimaduras em humanos está em declínio, graças aos programas de prevenção e rigorosas normas de construção civil. Mesmo assim, o risco de queimadura nos países em desenvolvimento como o Brasil ainda é muito alto²⁵.

Apesar dos avanços no tratamento, as taxas de mortalidade continuam elevadas. Invariavelmente, muitos dos métodos aplicados nos curativos são ainda controversos²⁶.

Segundo dados do Projeto Esperança Animal²⁷ as queimaduras em animais têm como causas mais comuns os agentes térmicos (água ou superfície quente e fogo) e os químicos (ácidos e substâncias cáusticas). As situações mais frequentes são: ingestão de alimentos caseiros quentes, água fervente derramada sobre o animal, animais que lambem produtos de limpeza, exposição excessiva ao sol e outros.

As queimaduras de primeiro grau apresentam clinicamente a epiderme eritematosa, edemaciada e são dolorosas²⁸. A resolução se dá em aproximadamente cinco a sete dias²¹.

Nas queimaduras de segundo grau, clinicamente, a pele se apresenta eritematosa, com presença de bolhas, edema acentuado e é extremamente dolorosa. À histologia, apresenta vasodilatação acentuada na derme e necrose coagulativa. Podem ser diferenciadas em superficial e profunda. As queimaduras de segundo grau atingem toda a epiderme e porção da derme, conservando uma quantidade razoável de folículos pilosos e glândulas sudoríparas. A reepitelização ocorre pelo crescimento de queratinócitos a partir da membrana basal da epiderme, que reveste os anexos dérmicos na profundidade da derme. Evoluem para reparação total da pele entre 14 e 21 dias²⁹.

As queimaduras de terceiro grau envolvem a necrose total da epiderme e da derme, não havendo a possibilidade de reepitelização por não existirem anexos dérmicos viáveis. Produzem severas lesões. Alguns autores consideram como lesões de quarto grau as áreas carbonizadas²¹.

As manifestações locais mais importantes da queimadura, independente do grau ou extensão, são as formações de substâncias tóxicas e seu acúmulo, dor intensa, perda de líquido corporal, destruição dos tecidos e, devido à perda da barreira protetora, as infecções³⁰.

A ferida de queimadura apresenta três áreas: necrose central, estase e a mais externa, que é conhecida como hiperemia reativa. Em decorrência da ação da ruptura dos queratinócitos, há liberação de actina que atrai plaquetas. Estas chegam dentro dos primeiros

segundos e liberam alfa tromboxano A, que por sua vez ativa a cascata da coagulação e o PDGF (fator de crescimento liberado das plaquetas), que também atua como quimiotático ativando a segunda categoria de células, os polimorfonucleares⁸.

Os leucócitos começam a aderir à parede do capilar mais próximo da lesão, por meio da molécula de L-selectina e secretam elastase, que separa as células endoteliais. Após a separação de células endoteliais, há alterações da permeabilidade capilar e edema, que é a característica fisiopatológica das queimaduras¹³.

Ocorre exposição do colágeno, com consequente ativação e liberação de histamina pelos mastócitos, aumentando a permeabilidade vascular, levando ao edema e a hipovolemia³¹. O Fator de Necrose Tumoral (TNF), por meio da indução de inflamação, aumenta a permeabilidade capilar e migração de leucócitos³².

Estas reações têm início alguns minutos após a queimadura, atingindo pico máximo em oito horas e regredindo progressivamente até voltar ao normal. Após a metabolização das substâncias desencadeadoras do aumento da permeabilidade vascular, o que ocorre em torno de 18 a 24 horas, o poro capilar retorna ao seu diâmetro original, aprisionando o colóide na área queimada, sustentando o edema tecidual²¹.

Em seguida a fase inflamatória aguda, ocorre a fase proliferativa da cicatrização que é dividida em três subfases e é responsável pela formação do tecido de granulação. A primeira subfase é a reepitelização que ocorre pela migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes; a segunda é a fibroplasia, na qual ocorre proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas; a terceira é a angiogênese que ocorre paralelamente à fibroplasia, onde os novos vasos dão suporte à formação da nova matriz³³.

As fases finais do processo cicatricial são constituídas pela contração e aumento da resistência da cicatriz. A contração é a redução de parte ou de toda a área da ferida aberta, ocorrendo de forma centrípeta, a partir das bordas da lesão sendo provocada pelos filamentos de actina dos miofibroblastos. A última fase é a de maturação ou remodelação, onde ocorre a substituição do colágeno tipo 3 pelo tipo 1, absorção de água, diminuição do número de vasos e pelo rearranjo das moléculas de colágeno^{34,35}.

2.2 Óleo de copaiba

As copaibeiras são árvores comuns à América Latina e África Ocidental³⁶ pertencentes à família das *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoida*, gênero *Copaifera* que alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos^{37,38}.

Da perfuração do tronco dessas árvores (sem corte das mesmas) é extraído o óleo de copaíba que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias³⁹.

A partir do século XVI, os primeiros colonizadores das Américas relataram que as índias aplicavam este óleo no umbigo dos recém-nascidos e os guerreiros, após as batalhas, em seus ferimentos, sendo observada sua utilização como agente antiinflamatório e cicatrizante. Este conhecimento dos índios adveio da observação de que animais quando feridos esfregavam-se no tronco das copaibeiras para cicatrizarem suas feridas³. Os colonos também descobriram que o óleo de copaíba pode ser utilizado como anti-séptico das vias urinária e respiratória⁴⁰.

Através da análise cromatográfica do óleo de copaíba foi verificado que a fração volátil é composta por sesquiterpenos, que solubiliza uma fração resinosa, composta por diterpenos⁴¹. A região sesquiterpênica é composta predominantemente por β -cariofileno, seguida de α -humuleno, mas também possui componentes importantes como o α -bisaboleno. Já a região diterpênica é composta por ácido copálico, ácido agalático, ácido 11-hidroxycopálico, 11-acetoxi-copálico, ácido hardwickiico e o ácido carenóico, entre outros^{42,43}.

O ácido carenóico possui ação antiinflamatória⁴³ por inibir a atividade de transcrição do Fator Nuclear - kB (NF-kB), que é uma molécula envolvida no processo de ativação dos macrófagos⁴⁴. Porém tem sido atribuída, à fase resinosa, uma atividade irritante sobre a pele⁴².

A oleorresina extraída pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes, de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos ou fatores abióticos⁴⁵. Porém apenas essas classes podem estar presentes na composição da oleorresina pura³⁷.

Entre os diterpenos, o ácido copálico é usado como marcador da oleorresina da copaibera, tendo em vista que foi o único encontrado em todos os óleos analisados por cromatografia gasosa para identificação da composição dos mesmos⁴⁶. Em relação aos sesquiterpenos da fração volátil, o principal constituinte relatado tem sido o β -cariofileno que é descrito na literatura como antiedêmico, antiinflamatório, bactericida e insetífugo⁴⁶. Em um estudo realizado foi verificado que o β -cariofileno inibe significativamente a migração celular

e o extravasamento protéico. Este estudo também sugere que ele atua inibindo a cascata do ácido araquidônico, mas não foi possível descrever seu mecanismo de ação⁴². Também têm sido atribuídas propriedades antiinflamatórias e analgésica ao α -bisaboleno⁴⁶.

3. OBJETIVO GERAL

Separar a fração volátil da oleorresina de copaíba e avaliar seu efeito sobre a cicatrização de queimadura cutânea induzida no dorso de ratos.

3.1 Objetivos específicos:

Extrair e identificar a composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial da oleorresina de copaíba adquirida para o experimento.

Incorporar o óleo essencial de copaíba a 1% a uma base de pomada oleosa.

Avaliar macro e microscopicamente o processo de cicatrização das queimaduras tratadas com a pomada produzida.

Identificar sinais de toxicidade com a aplicação tópica da pomada em ratos.

Propor o uso da pomada de óleo de copaíba como cicatrizante de queimadura cutânea em animais.

4. MATERIAIS E METODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Centro Universitário Vila Velha (UVV/ES). Os animais foram mantidos no Biotério do Complexo Nossa Senhora da Penha e acompanhados pelo veterinário Professor Dr. Vinícius Ricardo Cuña de Souza. A pomada de óleo essencial de copaíba foi desenvolvida pelo farmacêutico Professor Dr. Ary Gomes da Silva, no laboratório de Produção Farmacêutica da UVV.

4.1 Animais

Foram utilizados 31 ratos *Wistar*, fêmeas, peso médio de 263 ± 8 gramas, idade média de 223 ± 32 dias. Sete animais foram utilizados para biópsia de pele íntegra e posteriormente disponibilizados para outros experimentos. Os animais restantes foram divididos aleatoriamente em três grupos com oito indivíduos em cada: controle (GC), placebo (GP) e tratamento com pomada de óleo de copaíba (GOC). Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, ambiente climatizado com temperatura média de 22°C , ciclo dia/ noite definido, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

4.2 Procedimentos

4.2.1. Indução das queimaduras

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de oito horas, A sedação foi feita com Cloridrato de Xilazina (1,0 mg/Kg, IM) seguida da indução e manutenção com Cetamina (30,0 mg/Kg, IM). Após a tricotomia do dorso e antissepsia com polivinilpirrolidona iodo a 1% (PVP-I) foi produzida a queimadura por contato com barra de metal de 200 g com área de $3,8\text{ cm}^2$ (figura 1), aquecida em água a 120°C por 30 segundos e apoiada na pele por 5 segundos sem pressão excedente atingindo a epiderme e derme superficial⁴⁷. Todas as queimaduras foram produzidas de forma similar na região dorso-torácica e, portanto, submetidas à mesma tensão da pele. A área foi escolhida seguindo orientação de Ramsey *et al.*⁴⁸ quando cita que a contração das feridas é favorecida na pele mais frouxa e móvel, como a do tronco. Além disso, a região do dorso impossibilita que o animal coce ou retire a pomada com lambidas.

A fim de manter a microcirculação e impedir a progressão da queimadura, a região foi imediatamente coberta com gaze umedecida em solução isotônica de cloreto de sódio

resfriado (NaCl 0,9%), por 60 segundos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, monitorados por 12 horas quanto à evolução das lesões e do estado geral.



Figura 1 – Barra de metal com área de $3,8\text{cm}^2$ e peso de 200 g.
Fonte: foto do experimento.

4.2.2. Obtenção e purificação do óleo essencial

A oleorresina de copaíba foi adquirida por extrativismo em reserva legal numa propriedade rural do município de Santa Teresa, ES ($19^{\circ}55'37''\text{S}$; $40^{\circ}35'16''\text{W}$).

A extração, purificação e determinação da densidade do óleo essencial foram feitas no laboratório de Ciências Químicas da UVV. O óleo essencial foi extraído por destilação de arraste a vapor em até 6 horas de processo extrativo, até que não houvesse mais expressiva separação de óleo essencial a partir do destilado obtido. Na purificação do óleo essencial, a água residual do processo de extração foi congelada pela diminuição da temperatura ao ponto de congelamento da água para que, uma vez solidificada, o resíduo desta se separasse do óleo essencial que se mantém em fase líquida. A densidade do óleo essencial obtido foi determinada gravimetricamente pela pesagem de 1 mL do óleo em sala climatizada a 20°C . Na pesagem foi utilizada uma balança analítica com exatidão de 1,0 mg.

4.2.3 Análises cromatográficas

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, no Laboratório de Química Fina da Tommasi Analítica. O volume de injeção foi $2\mu\text{L}$, composto por 1,6 mL de uma solução de óleo essencial

(30mg/mL) e 0,4 mL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, tendo o *n*-hexano como solvente.

Na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas - CG-EM – o sistema utilizado consistiu de um cromatógrafo a gás da Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, Thermo Scientific®. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 J & W Scientific (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás de arraste foi o hélio e o programa de temperatura da coluna consistiu em aumentos de 3° C por minuto, entre 60° - 240° C. Os espectros de massa foram obtidos em 70 eV, a velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de m/z 40-500⁴⁹.

O tempo de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no âmbito do mesmo programa de temperatura foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats – KI e do Índice Aritmético de Van der Dool e Kratz - AI. A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada nos espectros de massas obtidos, na comparação deles com a biblioteca espectral de CG-EM nos KI e AI calculados em comparação com a literatura disponível⁴⁹.

4.2.4 Preparação das pomadas

As pomadas teste e placebo foram produzidas magistralmente no laboratório de Produção Farmacêutica da UVV. A pomada teste foi obtida a partir da incorporação do óleo essencial em vaselina, na concentração de 1,0% (peso/peso) de óleo essencial de copaíba. O produto final foi armazenado em bisnagas de alumínio opacas, revestidas internamente por superfície plástica, fechadas com tampa rosqueável. Não foram utilizados conservantes em virtude do meio exclusivamente oleoso da pomada apresentar desprezível atividade de água para permitir a proliferação de microrganismos⁵⁰.

A preparação do placebo seguiu rigorosamente os mesmos passos da preparação e acondicionamento da pomada teste. As pomadas receberam códigos que identificaram apenas para os pesquisadores a concentração de 1,0% bem como o placebo.

4.2.5 Acompanhamento das lesões

O tratamento teve início 24 horas após a indução da queimadura e foi realizado diariamente pela manhã durante 30 dias. Inicialmente as feridas de todos os grupos foram

limpas com solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl a 0,9%) . O grupo controle foi submetido à limpeza e permaneceu sem nenhum outro tratamento. Utilizando uma paleta de madeira estéril foram aplicados 500 µL de pomada base no grupo placebo e no grupo óleo de copaíba 500 µL de pomada teste. Aguardado 5 minutos para a secagem do produto os animais foram devolvidos as gaiolas.

Os animais foram acompanhados diariamente quanto ao estado geral da ferida (ótimo, bom, regular), aspecto da ferida (aberta ou fechada; com ou sem crostas) presença de edema (0=ausente, 1=discreto, 2=moderado, 3=intenso), exsudato (presente ou ausente) e peso.

No momento 0, 3, 7, 14, 21 e 30 dias após a queimadura as lesões foram fotografadas (Câmera digital Sony CyberShot H9 distância de 30 cm). As imagens digitalizadas foram tratadas para as avaliações métricas da evolução do processo cicatricial, utilizando o software ImageTool 3.0, onde a lesão foi demarcada e a área determinada em mm² . As medidas foram processadas por um observador sem que o mesmo tivesse acesso à identificação da imagem.

Também, as lesões foram submetidas à mensuração do maior e menor diâmetro de suas bordas com o paquímetro Vernier Calipers 150 X 0.02 MM (6” X 1/1000 IN) CLA 006 (figura 2). A partir destes elementos, a área foi calculada, utilizando-se a equação matemática recomendada por Prata *et al*⁵¹, $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da lesão.



Figura 2 – Mensuração dos diâmetros da lesão com paquímetro.

Fonte: fotos do experimento.

O cálculo do grau de contração foi expresso em percentual, utilizando-se as equações matemáticas propostas por Ramsey *et al*⁴⁸, $100 \times (W_o - W_i) / W_o = M \pm DP$, onde : W_o = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (0,3,7,14 e 21 dias), M = média e DP = desvio padrão.

4.2.6 Avaliação histológica

As biópsias de pele íntegra (dia 0) foram obtidas com Punch de 6 mm na região do dorso do animal correspondente a área da lesão do experimento.

Os tecidos para biópsias foram retirados com 3, 7, 14 e 21 dias após a queimadura utilizando Punch de 6 mm compreendendo os limites da lesão e do tecido íntegro. A lesão foi dividida em quatro quadrantes delimitando uma região específica para cada data de retirada, no sentido horário, permitindo o acompanhamento da evolução da cicatrização (figura 3).

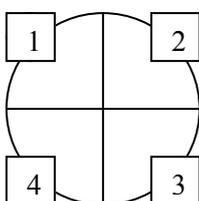


Figura 3 – Esquema das áreas definidas para biópsia da lesão.

Decorridos 30 dias após a queimadura, os animais foram eutanasiados, retirados fragmentos do baço, fígado e pulmão. Os materiais foram imersos em frascos contendo formol a 10% (pH 7,0) por período mínimo de 24 horas, identificados com o número do animal, dia da retirada e encaminhados ao laboratório de Patologia Veterinária da UVV para confecção das lâminas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os fragmentos foram cortados em micrótomo (LEICA RM 2125 RT), obtendo seções de 4 µm de espessura, submetidos à coloração por Hematoxilina Eosina (HE) e mantidos em estufa para secagem.

As lâminas foram analisadas no Instituto de Patologia – Vila Velha, Espírito Santo pelo médico patologista Prof. Alan Kardec Filho. Foi utilizado microscópio da marca Olympus DX51 com objetiva de 4X, 10X, 40X e 100X.

Para verificar microscopicamente a evolução da cicatrização foram considerados os seguintes achados histológicos: células polimorfonucleares, células mononucleares, proliferação fibroblástica, neovascularização, colagenização e reepitelização.

A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos, que considerou a intensidade dos achados histológicos classificando – os em ausente, discreto, moderado e acentuado.

4.3 Análise estatística

Os dados para avaliação da evolução das áreas das queimaduras dos grupos controle, placebo e tratado com pomada de óleo essencial de copaíba foram obtidos a partir das fotos da superfície das lesões, calibradas metricamente no programa ImageTool em mm².

Para corrigir pequenas discrepâncias de valores produzidas pelos diferentes tamanhos iniciais das queimaduras, as medidas das áreas em mm² foram transformadas em valores logarítmicos, visando à normalização da curva de distribuição dos dados, de modo a não comprometer uma das premissas necessárias à realização do teste paramétrico de regressão linear simples, que teve como variável resposta o logaritmo da área das feridas acompanhado ao longo dos 30 dias de monitoramento do tratamento.

A hipótese de nulidade testada foi a de que a pomada de óleo de copaíba não interferiria na evolução da cicatrização da queimadura. O nível de significância (α) utilizado para rejeição da hipótese de nulidade foi o de valores de $p \leq 0,05$ e coeficiente de determinação da reta (r^2) $\geq 0,5$ que expressa um poder de explicação mínimo de 50% para o modelo linear estimado em relação à variância presente no conjunto original de dados.

Para testar a hipótese de nulidade foi realizada a análise de regressão linear simples, considerando o tempo em dias de exposição aos tratamentos controle, placebo e pomada teste como variável independente; e a evolução da superfície de cicatrização da queimadura como variável dependente. Em seguida, as retas estimadas foram submetidas à ANCOVA, para detecção de diferenças entre seus interceptos e seus ângulos, delimitadas pelo teste de Tuckey a posterior ⁵².

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SYSTAT, versão 11.0.

5. RESULTADOS

5.1. Densidade e perfil fitoquímico do óleo essencial de copaíba

O óleo essencial apresentou densidade de $0,9175 \text{ mg.mL}^{-1}$. Através da análise cromatográfica (figura 4) foram identificadas 48 substâncias, das quais 14 foram consideradas majoritárias (tabela 1), pois correspondem a 95,80% da composição total do óleo essencial. As demais 34 perfizeram 4,2% da composição do óleo essencial, aparecendo em concentrações entre 0,01 e 0,6%.

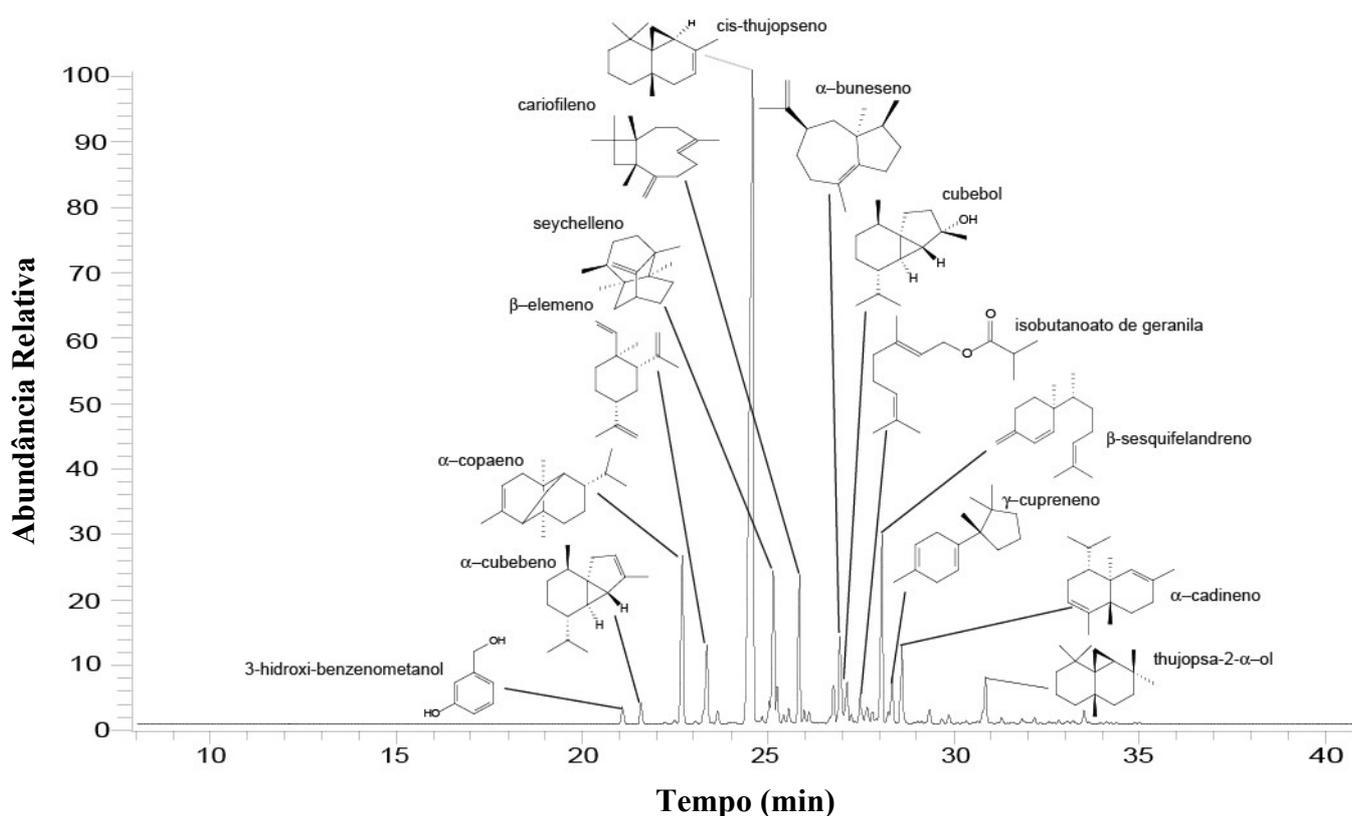


Figura 4 - Cromatograma em fase gasosa dos componentes do óleo essencial de *Copaifera langsdoffii*, evidenciando as moléculas dos compostos majoritários.

Tabela 1 - Componentes majoritários do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*, identificados após separação em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Comparação dos espectros de massa obtidos na biblioteca espectral e dos Índices Aritmético e de Kovats calculados com os disponíveis em Adams⁴⁹.

Índice Aritmético		Índice de Kovats		Identificação	%Area
Calculado	Adams, 2009	Calculado	Adams, 2009		
1426	1429	1427	1431	cis-thujopseno	46,96
1444	1444	1446	1446	seycheleno	8,04
1376	1374	1377	1376	α -copaeno	7,75
1525	1521	1526	1522	β -sesquifelandreno	7,34
1466	1464	1467	1466	cariofileno	6,71
1391	1389	1392	1390	β -elemeno	3,91
1536	1537	1538	1538	α -cadineno	3,27
1517	1514	1518	1515	isobutanoato de geranila	2,27
1530	1532	1532	1533	γ -cupreneni	2,26
1585	1586	1586	1587	thujopsan-2- α -ol	2,26
1504	1509	1505	1509	α -bulneseno	2,15
1512	1514	1513	1515	cubebol	1,24
1349	1348	1352	1351	α -cubebeno	0,91
1338	1339	1340	1341	3-hidroxi-benzenometanol	0,81

5.2 Avaliação clínica dos animais

Todos os ratos utilizados no experimento não apresentaram alterações no estado geral, confirmado pela regularidade no hábito evacuatório, miccional e alimentar.

Houve redução do peso médio no decorrer do experimento (peso inicial médio de $263,58 \pm 8$ g e final de $261,80 \pm 9,06$ g) que não foi significativa ($p = 0,4743$).

5.3 Avaliação macroscópica das queimaduras

A pomada apresentou bom poder de adesão à lesão, o que dispensou a utilização de curativos. Não houve nenhum sinal de irritação ou intolerância ao produto.

No 3º dia após a queimadura as feridas apresentaram-se fechadas, houve formação de crosta com fibrina e exsudato em todos os grupos.

O grupo controle desenvolveu crosta mais abundante com exsudato e permaneceu com esta por mais tempo que o grupo placebo e grupo óleo de copaíba. O grupo placebo apresentou crosta mais fina e maleável, mas bem aderida. O grupo óleo de copaíba apresentou crosta fina, limpa, seca e que se descolou facilmente durante a higienização com solução salina (figura 5).

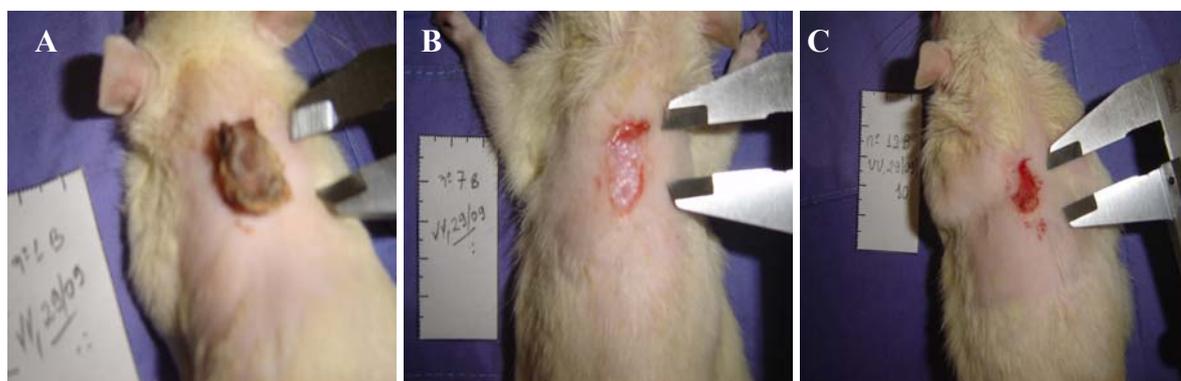


Figura 5 - Crosta no 14º dia no animal do grupo controle (A), placebo (B) e teste (C).

O edema foi intenso no grupo controle, moderado a intenso no placebo e ausente no grupo óleo de copaíba (tabela 2). No 7º dia nenhum dos animais apresentou edema.

Tabela 2. Classificação do edema nas lesões dos grupos estudados no 3º dia.

ANIMAL	GC	GP	GOC
I	3	2	1
II	3	2	0
III	2	3	0
IV	3	2	0
V	3	3	0
VI	3	2	0
VII	3	2	0
VIII	3	2	0

Legenda. GC = grupo controle, GP = grupo placebo e GOC = grupo tratado com pomada de óleo de copaíba. 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado e 3 = intenso.

A regressão linear simples utilizada para avaliar a evolução do logaritmo das áreas (LAREA) das queimaduras de todos os grupos apresentou retas altamente significativas ($p = 0,000$) com ângulos diferentes de zero e coeficientes angulares negativos (figura 6), demonstrando que todas as feridas reduziram suas áreas (figuras 7, 8 e 9).

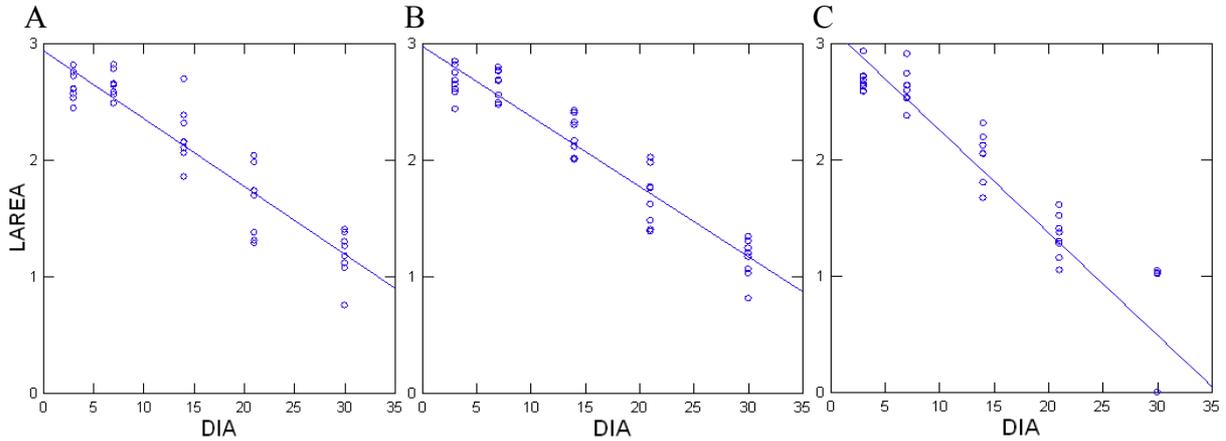


Figura 6 - Diagrama de regressão linear para a evolução do logaritmo das áreas (LAREA) das feridas originadas por queimaduras, ao longo de 30 dias de tratamento dos grupos estudados. **A:** controle (GC); **B:** placebo (GP); **C:** tratado com pomada de óleo de copaíba (GOC).

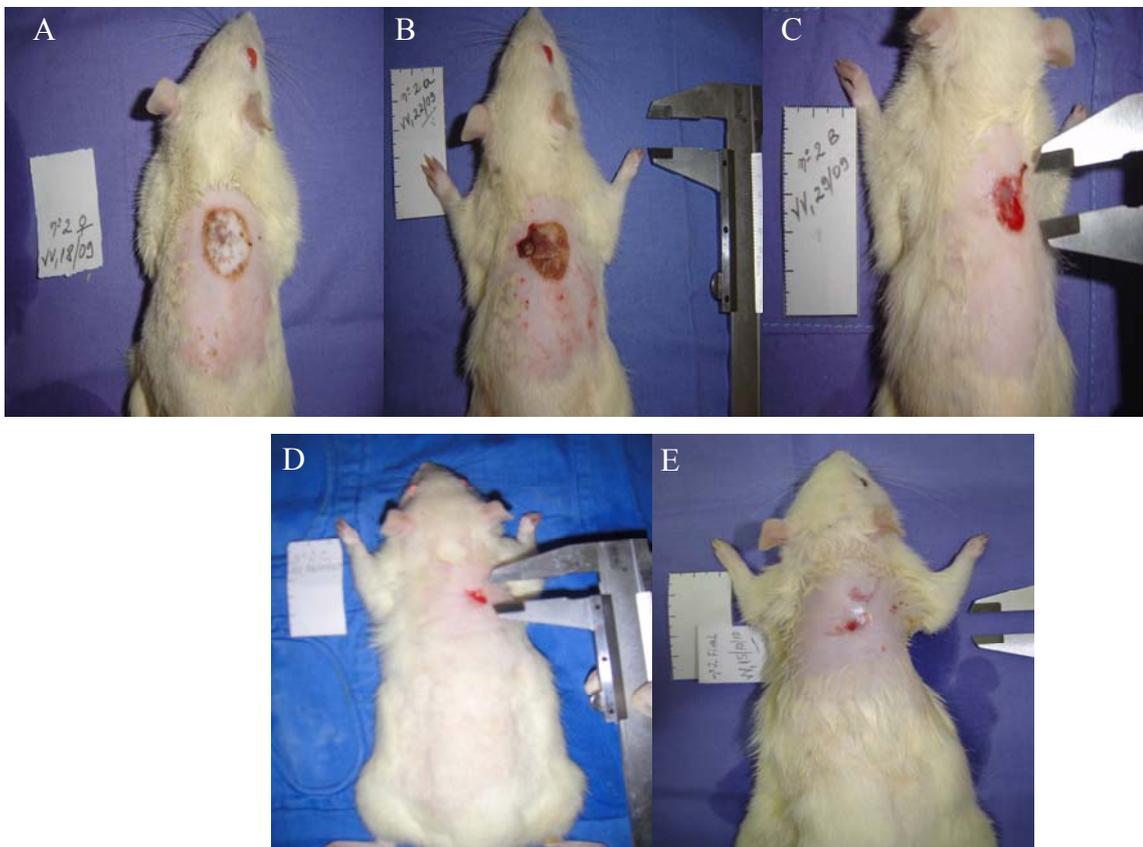


Figura 7 - Animal do grupo controle nos dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E).

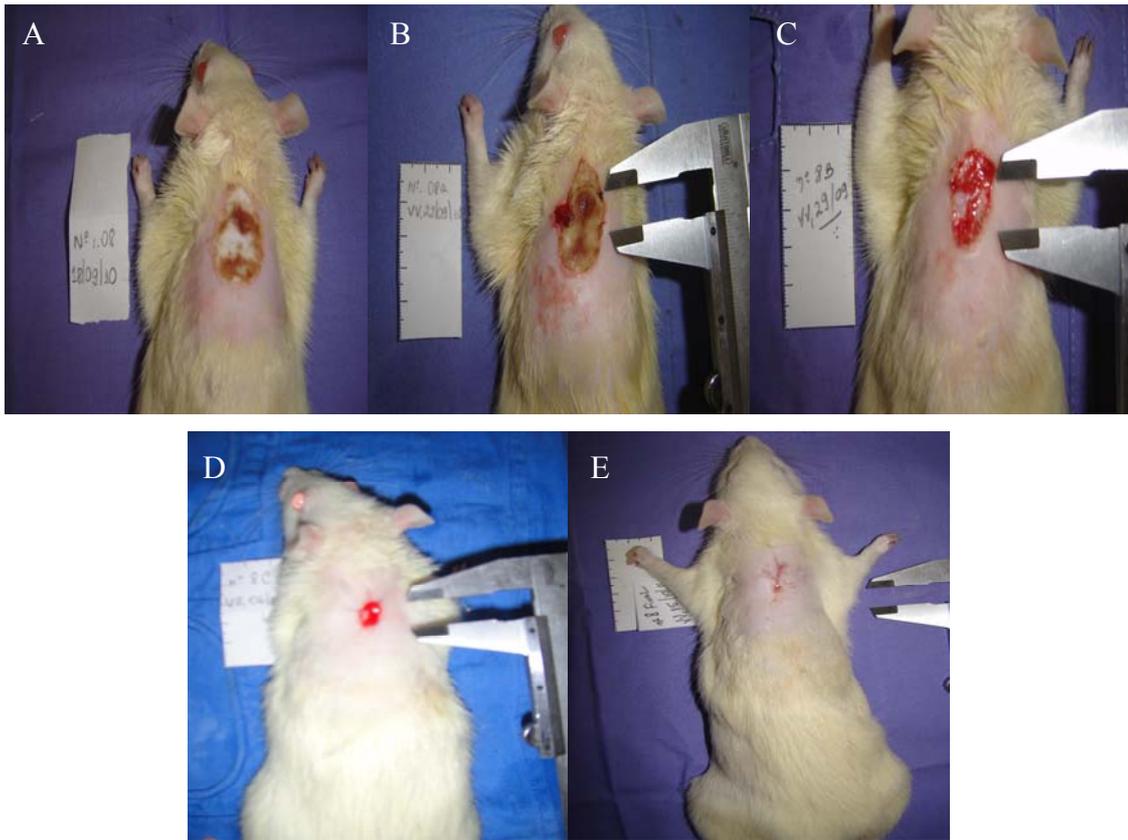


Figura 8 - Animal do grupo placebo nos dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E).

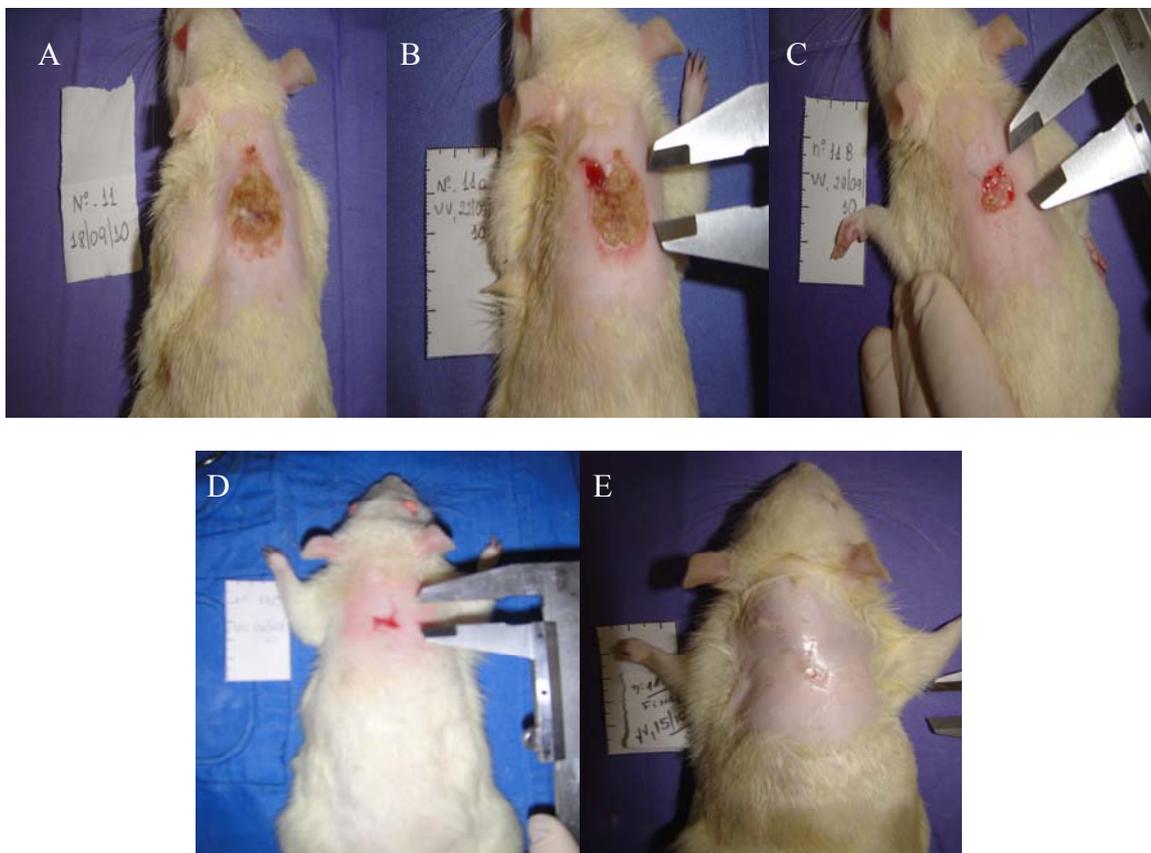


Figura 9 - Animal do grupo óleo de copaíba nos dias 3 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 30 (E).

O coeficiente de determinação (r^2) das retas conseguiu explicar 86,7%, 91% e 89,6% da variância do conjunto de dados dos grupos controle, placebo e óleo de copaíba respectivamente, permitindo aceitá-las para explicar a interferência dos tratamentos sobre a evolução da cicatrização (tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros estimados para a regressão linear simples da cicatrização da queimadura submetida aos tratamentos com solução salina, solução salina + pomada placebo e solução salina + pomada de óleo de copaíba a 1,0% (OC-1,0%).

Parâmetro	Controle	Placebo	Teste
Constante \pm EP	2,938 \pm 0,065	2,974 \pm 0,055	3,136 \pm 0,087
Coeficiente angular \pm EP	-0,933 \pm 0,004	-0,954 \pm 0,003	-0,947 \pm 0,005
<i>t</i>	-15,986	-19,604	-18,138
<i>F</i>	255,543	384,310	328,981
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000
<i>r</i>	0,933	0,954	0,947
r^2	0,867 (86,7%)	0,910 (91%)	0,896 (89,6%)
Auto - correlação	0,154	0,291	0,185

Legenda: EP - Erro Padrão; *t* – Estatística *t* de Student; *F* – Razão de Fischer; *p* - Nível de Significância; *r* - Coeficiente de Correlação Múltipla; r^2 - Coeficiente de Correlação Múltipla Quadrado

Não houve diferenças significativas entre os interceptos das retas de regressão calculadas, detectáveis pela ANCOVA ($F = 2,59$, $p = 0,11$, $gl = 2$, $r = 0,95$, $r^2 = 0,90$), porém houve diferença significativa entre seus ângulos ($F = 18,29$, $p = 0,00$, $gl = 2$, $r = 0,95$, $r^2 = 0,90$). Os ângulos das retas calculadas para os grupos controle e o placebo não diferiram significativamente entre si, mas ambas apresentaram ângulos significativamente menores que o da reta do grupo teste (tabela 4), indicando maior velocidade de cicatrização no grupo tratado com a pomada de óleo essencial de copaíba.

Tabela 4 - Diferenças entre os ângulos das retas estimadas para a evolução da área das feridas induzidas por queimadura na pele de ratos *Wistar*, em função da exposição por 30 dias aos tratamentos dos grupos controle, placebo e teste, verificado pelo Teste de Tuckey.

Grupos		Δ -ângulos	<i>p</i>
Controle	Placebo	-0.008	0.987 ^{ns}
Controle	Teste	0.252	0.000 ^{as}
Placebo	Teste	0.260	0.000 ^{as}

Legenda: Δ : diferença; **ns**: não significativo; **as**: altamente significativo

Na avaliação da contração da ferida verificou-se que no 3º dia do experimento houve valores médios negativos de retração demonstrando aumento da área da lesão nos grupos controle e placebo. Enquanto que o grupo óleo de copaíba demonstrou valores médios de retração positivos evidenciando maior força de contração centrípeta na superfície da queimadura deste grupo (tabela 5).

Tabela 5 - Percentual médio e desvio padrão da contração da ferida dos grupos controle (GC), placebo (GP) e óleo de copaíba (GOC).

TEMPO / DIAS	% DE CONTRAÇÃO DA FERIDA			
	3	7	14	21
GC	-6,64 ± 0,18*	15,10 ± 0,18*	71,48 ± 0,18*	88,22 ± 0,45*
GP	-0,59 ± 0,02*	24,18 ± 0,67*	65,82 ± 1,12*	91,12 ± 0,68*
GOC	2,20 ± 0,06*	31,68 ± 0,79*	84,74 ± 1,43*	98,09 ± 0,36*

* Todos os valores tiveram diferença estatística significativa entre as médias das linhas e entre as médias das colunas ($p \leq 0,001$) obtido pelo teste ANOVA.

Na análise dos dados do 7º dia do experimento, todos os grupos apresentaram aumento da retração da ferida. A contração da lesão foi calculada até o 21º dia, momento em que as queimaduras do grupo teste encontravam-se cicatrizadas, enquanto dos grupos controle e placebo necessitaram de mais alguns dias para a resolução total (figura 10).

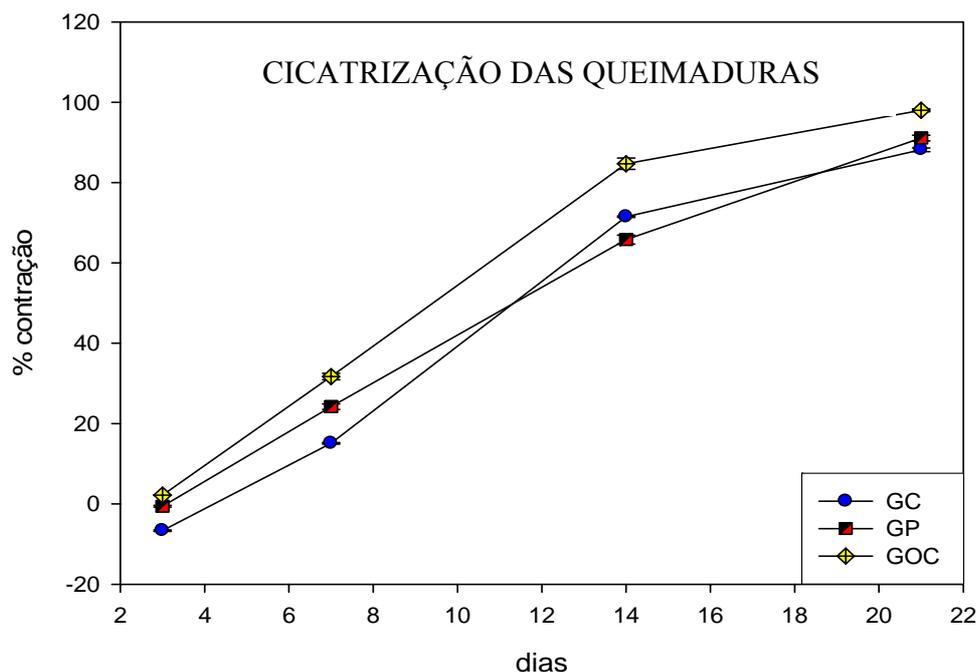


Figura 10 - Valor médio e desvio padrão do percentual de contração das queimaduras no 3º, 7º, 14º e 21º dias de evolução da cicatrização nos grupos controle (GC), placebo (GP) e tratado com pomada de óleo de copaíba (GOC).

5.4 Avaliação microscópica das queimaduras

No 3º dia verificou-se em todos os grupos, a presença de crosta fibrino leucocitária espessa, acentuado infiltrado de células polimorfonucleares, edema e detritos celulares. No grupo pomada óleo de copaíba presença moderada de vasos neoformados e fibroblastos (figuras 11, 12 e 13).

Avaliando as lâminas do 7º dia, foram observados nos grupos controle e placebo, achados histológicos semelhantes aos ocorridos no terceiro dia acrescido de vasos neoformados e moderada proliferação fibroblástica (figura 14). O grupo pomada de óleo de copaíba apresentou melhor arranjo fibroblástico (figura 15).

No 14º dia, o grupo controle apresentou crosta limpa, discreta quantidade de células polimorfonucleadas, proliferação fibroblástica intensa, neovascularização e início da reepitelização no tecido profundo. O grupo placebo demonstrou escassas células polimorfonucleares, proliferação fibroblástica e reepitelização presente a partir das bordas das lesões. No grupo óleo de copaíba observou-se acentuada presença de fibroblastos, fibras colágenas e processo de reepitelização intenso.

No 21º dia, as feridas dos três grupos apresentavam-se reparadas com achados histológicos característicos da etapa final do processo de cicatrização, tais como presença

intensa de fibroblastos, fibras colágenas e completo processo de reepitelização. O grupo óleo de copaíba apresentou melhor organização das fibras colágenas (figura 16).

Não foi encontrada reação eosinofílica significativa em nenhuma das lâminas examinadas.

Na análise histológica do baço, fígado e pulmão dos animais não foram encontradas alterações, demonstrando que o uso tópico da pomada de óleo de copaíba a 1% não foi capaz de causar modificações nestes órgãos durante o período do experimento.

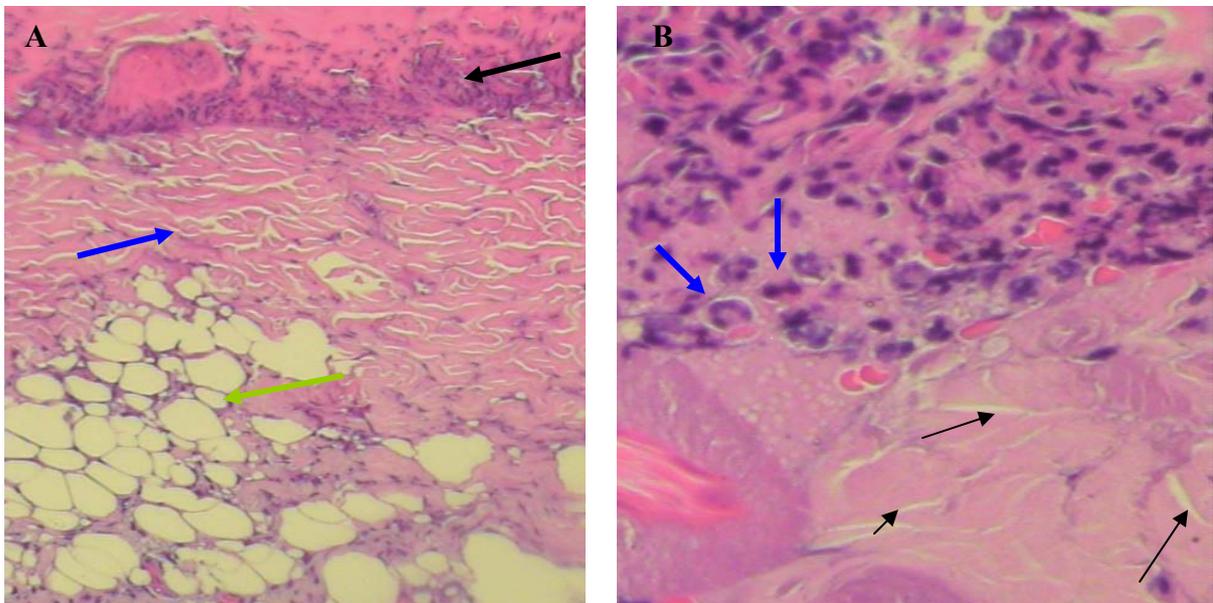


Figura 11 - Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos da biópsia da queimadura do animal do grupo controle no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras (imagem negativa do edema), seta verde imagens de tecido gorduroso e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B) Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) setas azuis e imagens brancas das áreas de edema com setas pretas. Aumento 40 x.

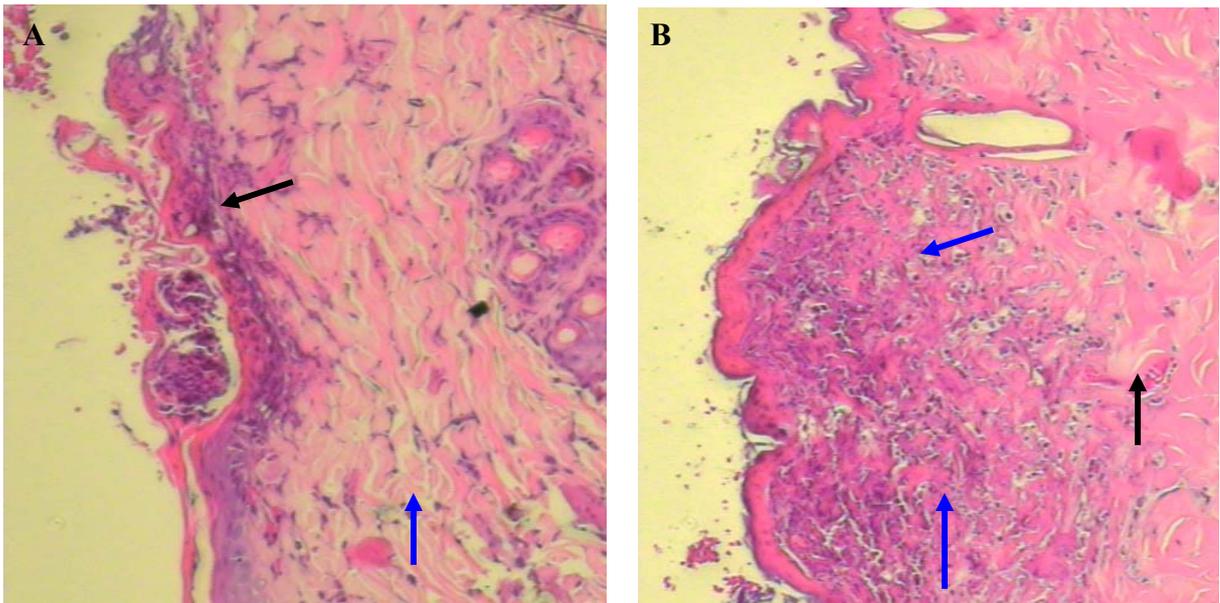


Figura 12 - Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos da biópsia da queimadura do animal do grupo placebo no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras colágenas (imagem negativa do edema) e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B) Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares em setas azuis e imagens brancas das áreas de edema seta preta. Aumento 4 x.

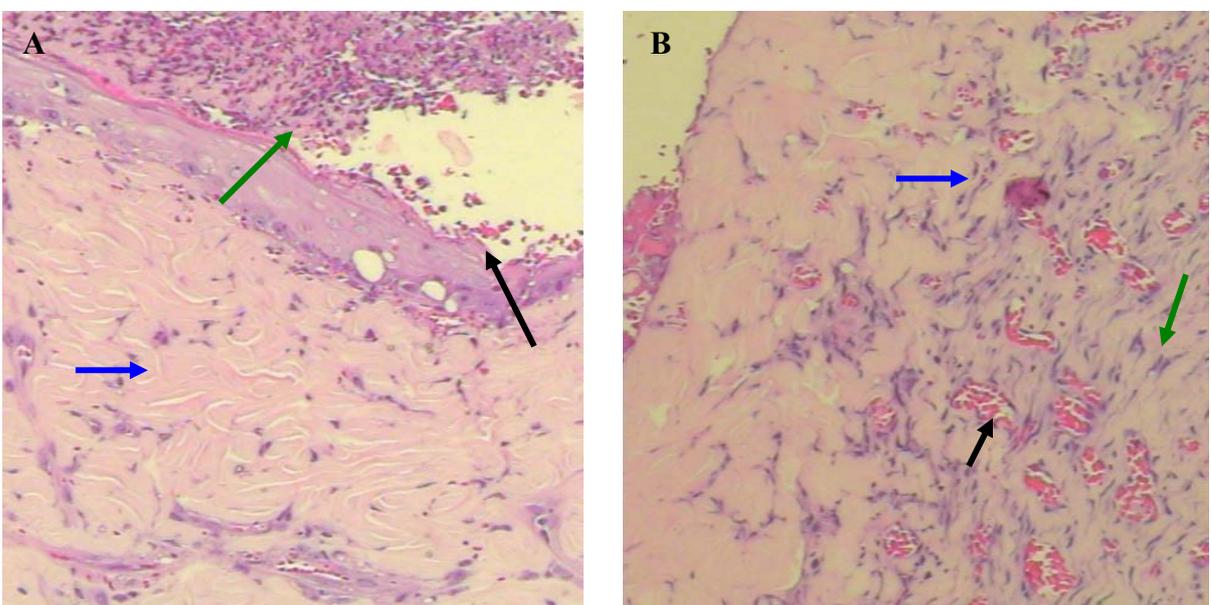


Figura 13 - Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos da biópsia da queimadura do animal do grupo copaíba no 3º dia do experimento. (A) Destaca – se com seta azul áreas de dissociação de fibras (imagem negativa do edema), seta verde imagens da crosta descamando e seta preta para epiderme necrótica. Aumento 10 x. (B) Evidencia – se infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (seta azul), neoformação vascular (seta preta) e fibroblastos (seta verde). Aumento 40 x.

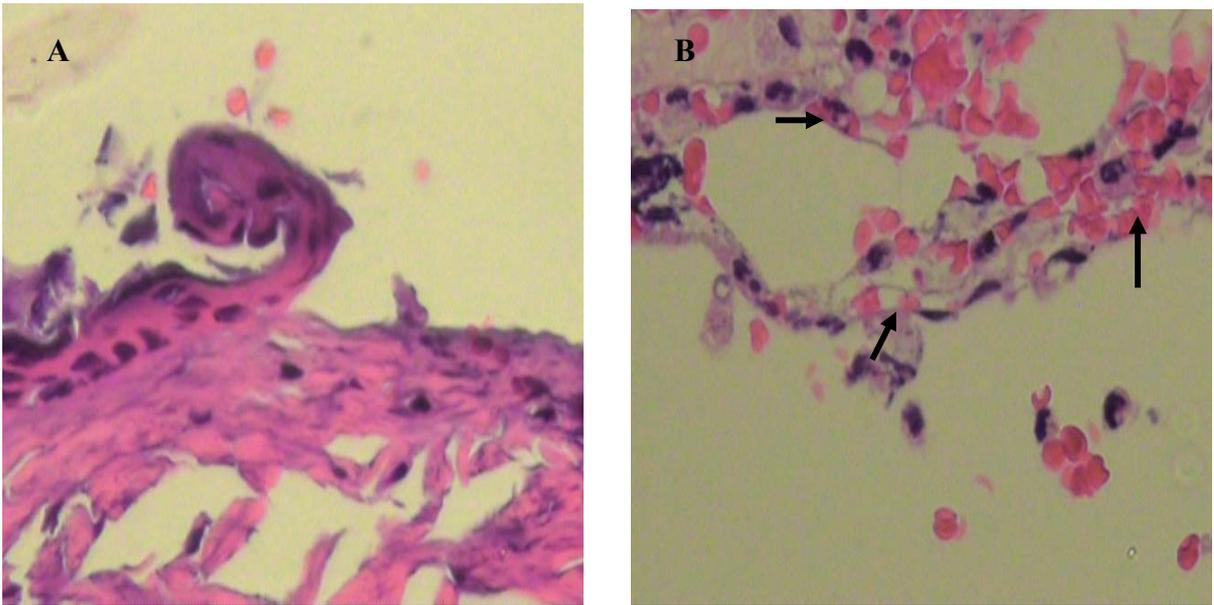


Figura 14 - Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos da biópsia da queimadura do animal do grupo controle no 7º dia do experimento. (A) Imagem de epiderme necrótica descamando (crosta). Aumento 40 x. (B) Presença de vasos neoformados (corte longitudinal). Setas pretas evidenciando hemácias. Aumento de 40 x.

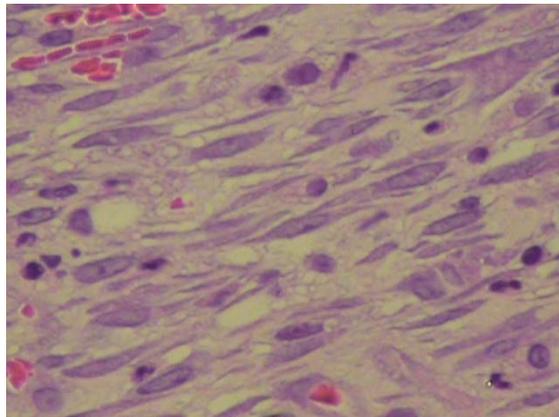


Figura 15 - Imagem fotográfica digital ilustrando corte histológico da biópsia da queimadura do animal do grupo copaíba no 7º dia do experimento evidenciando o alinhamento dos fibroblastos. Aumento 40 x.

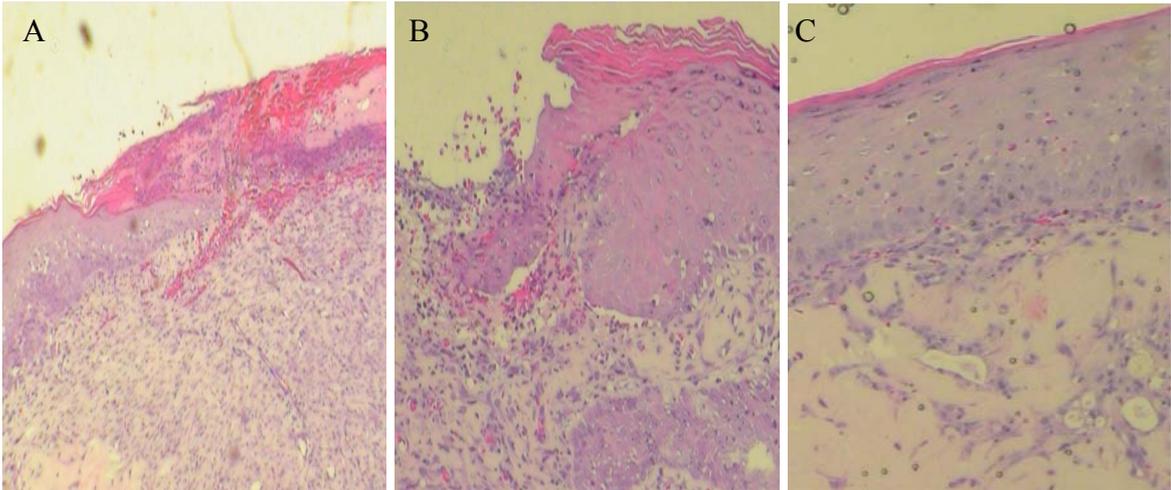


Figura 16 - Imagens fotográficas digitais ilustrando os cortes histológicos das biópsias das queimaduras dos animais dos grupos controle (A), placebo (B) e copaíba (C) no 21º dia do experimento. (A) Epiderme em fase final de regeneração com pequena área de lesão. (B) Epiderme com regeneração pronunciada aproximando as bordas. (C) Imagem de epiderme regenerada, revascularização e ausência de anexos. Aumento de 40 x.

6. DISCUSSÃO

6.1. O óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Dess.

Os sesquiterpenos foram os compostos majoritários do óleo essencial de copaíba. O *cis*-thujopseno apresentou a maior proporção na composição do óleo essencial analisado, representado 46,96% do total. Na faixa de 6,71%, o cariofileno que aparece mais frequentemente associado ao óleo de copaíba, representou o quinto componente e sua concentração ainda foi inferior que as do seycheleno, do α -copaeno e do β -sesquifelandreno.

Os estudos sobre o que é conhecido popularmente como óleo de copaíba, se concentram na análise da oleorresina, que é uma solução natural de ácidos diterpênicos⁴⁶ em óleos essenciais que é composto principalmente de sesquiterpenos⁵³. As concentrações e a natureza dos sesquiterpenos e diterpenos podem variar, mas estas duas classes de produtos naturais são as únicas que devem estar sempre presentes nos óleos de copaíba³⁷.

Os sesquiterpenos mais comuns são os cariofileno, copaeno, zingibereno, bisaboleno e bergamoteno. Os principais diterpenos são os ácidos caurenóico, hardwichiico, kovalenico, polialtico e copálico, sendo este último considerado um diterpeno típico do gênero *Copaifera*⁵⁴. Não há relatos específicos sobre a composição do óleo essencial de copaíba. Estudos demonstraram uma semelhança característica dos compostos sesquiterpênicos no perfil dos óleos de copaíba da *Copaifera duckei* Dwyer, *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, sendo o cariofileno a principal substância nos últimos dois óleos⁵⁵.

Os principais compostos dos óleos de *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke foram os sesquiterpenos β -cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno e γ -cadineno, apresentando diferentes proporções em cada óleo. Dentre eles, o β -cariofileno foi mencionado em estudos de vários óleos essenciais como anti-inflamatório, anti-edemico, anestésico local, antimicrobiano e antioxidante⁵⁵.

Os principais esqueletos de diterpenos descritos nos óleos de copaíba são os de caurano, labdano e cleorodano. As estruturas mais comumente detectadas por espectrofotometria de cada um destes esqueletos de diterpenos são o ácido copálico, ácido hardwichiico e o ácido carenóico, sendo que o ácido copálico foi encontrado em todos os óleos de copaíba analisados⁴¹.

6.2. A cicatrização das feridas induzidas por queimaduras

O impedimento da progressão dos danos causados pela queimadura para além da área e espessura desejadas foi realizado pela utilização de gaze umedecida em solução isotônica de cloreto de sódio, resfriada por imersão do frasco em um recipiente com gelo. Estudiosos afirmam que o resfriamento da ferida causada por queimadura é uma medida de urgência que demonstrou ser benéfica na prática clínica e experimental. A crioterapia melhora a resposta tissular à lesão térmica e minimiza as consequências sobre o tecido. A temperatura ótima na qual é obtido o benefício máximo permanece indeterminada⁵⁶.

No presente estudo não foi observado sinais de infecção em nenhum animal. O grupo controle apresentou crosta abundante e aderida que permaneceu por mais dias comparado aos grupos placebo e pomada teste, o que pode ter provocado o retardo da contração da ferida. Além disso, o edema foi mais acentuado tanto no controle quanto no placebo o que pode favorecer o afastamento das bordas da ferida e como visto, o aumento da área da queimadura.

Novato⁵⁷ relata que a crosta era considerada uma cobertura natural para proteger as feridas de bactérias e auxiliar na regeneração epitelial. Entretanto, têm se notado que feridas sem crosta cicatrizam mais rapidamente, além do que fluidos podem se juntar embaixo e favorecer a infecção. A crosta também pode interferir na cicatrização, evitando a contração da ferida.

Jaskille *et al*⁵⁸ observaram que a lesão térmica aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (citocinas) e que atuam como fator perpetuante da resposta inflamatória. Embora fundamentais para a sinalização, ativação das células de reparo e da síntese protéica, a concentração excessiva dessas moléculas promove elevada ação inflamatória. O próprio processo de reposição volêmica produz radicais livres que levam danos adicionais aos tecidos envolvidos na queimadura⁵⁹.

O acúmulo de líquido inflamatório é, portanto, indesejável haja vista que limita a capacidade das células reparadoras migrarem para dentro da ferida, aumentando o risco de infecção. A reação inflamatória intensa pode prejudicar o processo de reparo por promover edema, quantidade excessiva de exsudato, os quais favorecem deiscência, crescimento bacteriano e conseqüentemente, a inibição da proliferação de fibroblastos e da deposição de colágeno²⁸.

No terceiro dia, a pomada de óleo essencial de copaíba provocou a ausência completa de sinais inflamatórios agudos como edema e hiperemia corroborando a ação antiedematosa e antiinflamatória dos sesquiterpenos⁵⁵.

Considerando a redução da área e o percentual de contração das feridas, observa-se que quanto mais próximo do fechamento da falha cutânea, menor a força de contração, demonstrando que apesar do arranjo da molécula de colágeno exercer efeito na diminuição da área da ferida, a ação dos miofibroblastos durante a fase proliferativa foi maior. Os miofibroblastos costumam migrar para a lesão após dois ou três dias, unindo-se e através de sua capacidade contrátil promovem a retração da ferida. Esta pode atingir de 50 a 70% do tamanho inicial, os miofibroblastos alcançam seu maior valor no 7º dia após a abertura da ferida, quando então passa a ocorrer o seu decréscimo⁶⁰.

Em todos os momentos do experimento o grupo pomada teste permaneceu com a porcentagem de contração da ferida positiva e crescente comparado aos grupos controle e placebo que apresentaram inicialmente um afrouxamento do tecido conjuntivo adjacente à pele queimada com aumento da área da lesão (tabela 5). A distensão pode ter persistido devido ao edema, sugerindo uma resposta antiinflamatória na área tratada com o óleo essencial de copaíba.

A atividade antiinflamatória de *C. langsdorffii* tem sido comumente atribuída ao ácido caurenóico presente na oleorresina, um diterpeno que inibe a atividade de transcrição do fator nuclear- κ B (NF- κ B) que é um marcador importante envolvido na ativação de macrófagos⁶¹. Porém, o óleo essencial estudado evidenciou este efeito antiinflamatório, mesmo na ausência do ácido caurenóico em sua composição. Na falta de informações sobre os demais componentes do óleo essencial, é possível associar este resultado ao β -cariofileno que já foi mencionado em vários estudos como antiinflamatório, antiedema, anestésico local, agente antimicrobiano e antioxidante⁵⁴.

Na literatura investigada não foi encontrado nenhum experimento utilizando óleo essencial de copaíba em queimadura. Vários são os relatos da ação da oleorresina em feridas induzidas, com resultados diversos^{54, 55, 61, 62, 63, 64, 65}.

Estudos histológicos revelam não haver diferenças no processo de cicatrização de queimaduras e outros tipos de feridas⁶².

Em estudo para avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos tratadas com óleo de copaíba puro de *C. reticulata* foi observado aumento da crosta da lesão, do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, com diminuição do número de fibras colágenas. Em torno da ferida formou-se uma escara com perda de pêlos⁶³.

Em outro experimento avaliaram a contração e a força de tensão da ferida em ratos tratados com solução salina para o controle e duas concentrações diferentes da oleorresina de

C. langsdorffii (2% e 4%). Os resultados mostraram que os tratamentos com o óleo de copaíba aumentaram a força de tensão e a contração da ferida nos dias cinco e nove de tratamento, sendo que nos outros dias de avaliação não houve diferença entre os grupos⁶⁴.

Os resultados desta pesquisa concordam com os achados de Eurides *et al.*⁶⁵ que trabalharam com óleo de copaíba *in natura* (*C. langsdorffii*) em cicatrização de feridas cutâneas em camundongos e descreveram melhora no processo cicatricial dos animais do grupo tratado.

Em um estudo para avaliar uma pomada contendo óleo de *C. langsdorffii* na concentração de 10% houve aumento da neoangiogênese do retalho cutâneo subdérmico em ratos⁶⁶. Em outra investigação, concluiu-se que o tratamento tópico com óleo puro de *C. langsdorffii* prejudicou o processo de reparação normal da ferida na presença de corpo estranho. Ao longo do experimento os grupos tratados com óleo de copaíba apresentaram maior edema, hiperemia, permanência de crostas e ao final maior fibrose⁶¹.

Neste trabalho, a fração de óleos essenciais foi separada da resinosa para os ensaios da queimadura. Alguns estudos concluíram que a oleorresina de *C. multijuga* apresenta efeito irritativo no peritônio, evidenciado pelas aderências e que volumes não absorvidos deste óleo têm relação direta com a formação de abscessos cavitários em ratos⁶⁷.

De acordo com estudos realizados, notou-se que a oleorresina de *C. langsdorffii* previne úlceras gástricas e promove a cicatrização de feridas, e isso só foi possível através da análise dos efeitos desta sobre a lesão intestinal associada à isquemia mesentérica e reperfusão em ratos. Os dados indicam que a oleorresina tem uma ação protetora contra isquemia seguida de reperfusão, o que parecia ser, pelo menos em parte, devido a uma ação antioxidante e um mecanismo de peroxidação lipídica⁴³.

Numa comparação histológica do processo de cicatrização em feridas cutâneas em dorso de ratos adultos tratados em grupos com duas aplicações tópicas diárias de soro fisiológico, digluconato de clorexidina a 0,12% e oleorresina de copaíba por 15 dias, a mesma demonstrou que, nos períodos inicial e final, havia um padrão semelhante de cicatrização entre os tratamentos; no período intermediário de 7 dias, as feridas cutâneas estavam completamente epitelizadas, apesar do grupo óleo apresentar um processo de reparo do tecido conjuntivo mais lento⁶⁸.

A atividade antiinflamatória tópica do óleo essencial do pericarpo de *C. langsdorffii* Desf, cuja composição química terpenoidal foi avaliada em ratos utilizando carragenina para induzir o edema de pata, foi confirmada com a inibição do processo edematogênico similar ao

resultado do controle positivo tratado com indometacina, um clássico bloqueador da atividade da ciclooxigenase⁶⁹.

Diante da vasta aplicação popular do óleo de copaíba e da importância econômica de sua exploração para o Brasil, este estudo vem contribuir com uma nova possibilidade terapêutica e incentivar novos estudos sobre sua ação na cicatrização de queimaduras.

7. CONCLUSÃO

Os resultados descritos permitem inferir que a pomada de óleo essencial de copaíba a 1% acelerou a cicatrização de queimaduras em ratos.

Na análise cromatográfica do óleo essencial utilizado no experimento foram identificadas 48 substâncias das quais 14 foram consideradas majoritárias. Dos sesquiterpenos descritos na literatura como mais comuns foram encontrados o cariofileno (6,71 %), copaeno (7,75%), além destes foram identificados o cis- thujopseno (46,96%), o seycheleno (8,04%), sesquifelandreno (7,34%) dentre outros.

Na avaliação macroscópica da lesão dos animais tratados com pomada de óleo essencial de copaíba a 1% foi observada a ação antiinflamatória com menor edema e crosta, além da capacidade em estimular maior contração centrípeta das bordas das feridas em todos os dias de avaliação determinados no experimento.

Na observação microscópica não foi encontrada reação eosinofílica confirmando a avaliação macroscópica onde os animais não apresentaram sinais de processo alérgico. A normalidade dos achados histológicos do baço, fígado e pulmões confirma que a pomada teste não provocou lesão nestes órgãos.

O grupo pomada de óleo de copaíba apresentou maior angiogênese logo no 3º dia do experimento, menor dissociação das fibras colágenas (menor edema), presença mais abundante de fibroblastos e melhor orientação das fibras de colágeno. Ao final de 21 dias a regeneração foi completa com epiderme e derme íntegras, enquanto que os grupos controle e placebo necessitaram de mais dias para a reparação total.

Neste trabalho foi demonstrado o potencial terapêutico da pomada de óleo essencial de copaíba no tratamento de queimaduras em ratos, porém novos estudos ainda são necessários para esclarecer seu mecanismo de ação e a confirmação destes achados em outros modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

- 1 Barbudo GR, Beletti ME, Eurides D, Selmi AL. Reparação de feridas cutâneas de roedores da espécie *Calomys Callosus*, tratadas com hidrocarboneto alifático: aspectos morfométricos, morfológicos e histológicos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2001; 38(2): 62-65.
- 2 Iurk LK, Oliveira AF, Gragnania A, Ferreira LM. Evidências no tratamento de queimaduras. *Rev. Bras. Queimaduras.* 2010; 9(3):95-99.
- 3 Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Júnior VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova.* 2002; 25(3):429-438.
- 4 Rossi LA, Menezes MAJ, Gonçalves N, Coifi Silva CL, Farina Junior JÁ, Stucji RAG *et al.* Cuidados locais com as feridas das queimaduras. *Rev. Bras. Queimaduras.* 2010; 9(2):54-59.
- 5 Mello PB, Sampedro RMF, Piccinin AM. Efeitos do laser HeNe e do modo de aplicação no processo de cicatrização de queimaduras em ratos. *Fisioter. Pesq.* 2007; 14(2):6-13.
- 6 Coelho COM, Rezende CMF, Tenório APM;. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. *Cienc. Rural.* 1999;29(2):297-303.
- 7 Moncrief JA, Lindberg RB, Switzer WE, Pruitt BAJR. Use of topical antibacterial therapy in the treatment of the burn wound. *Arch Surg.* 1966; 92(4):558-565.
- 8 Bolgiani NA, Serra MCVF. Atualização no tratamento local das queimaduras. *Rev. Bras. Queimaduras.* 2010; 9(2):38-44.
- 9 Ragonha ACO, Ferreira E, Andrade D, Rossi LA. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. *Rev Latino-am de Enfermagem.* 2005; 13(4):514-21.
- 10 Bishara SA, Shady NH, Gunn SW. New technology for bum wound closure and healing. A review. *Bums.* 2005; 35:944 -956.

11 Medeiros AC, Ramos AMO, Dantas Filho AM, Azevedo RCF, Araújo FLFB. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. *Acta Bras Cir.* 1999;14(4).

12 Monstrey S, Hoeksema H, Saelens H, Depuydt K, Hamdi M, Van Landuyt K, Blondeel P. A conservative approach for dermal burn wounds using polarized-light therapy. *Brit. J. Plast. Surg.* 2005; 55:420-426.

13 Andrade AG, Lima CF, Albuquerque AKB. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras. *Rev. Bras. Queimaduras.* 2010; 9(1):21-30.

14 Boles MM, Lyra MC, Orgaes FAFS, Marques BPA, Gonella H A. Tratamento inicial das queimaduras com Hidrogel a base de água, óleo de *Melaleuca alternifolia* e emulsificantes. *Rev. Bras. Cir. Plast.* 2008; 23(4): 328-331.

15 Busnardo CA, Freitas PMC, Eurides D, Roncetti GR, Nunes LC, Beletti ME. Peritônio de bovino como bandagem em queimaduras cutâneas experimentais em coelhos. *Ci. Anim. Bras.* 2009; 10(3):823-828.

16 Lee JA, Jeong HJ, Jeon S, Hong S. Acupuncture accelerates wound healing in burn injured mice. *Burns*, 2010.

17 Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, Albuquerque AR, Silva Jr VA. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(3):196-209.

18 Nitz AC, Ely JB, D'Acampora AJ, Tames DR, Corrêa BP. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas em ratos, usando: *Coronopu didymus e Calendula officinali*. *Arq. Catarin. Med.* 2006; 35(4):74-79.

19 Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham ACF, Sains-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(supl. 3):55-65.

20 Vitorino Filho RNL, Batista MCS, Verçosa BLA, Silva SMMS, Machado ASF, Bonfim JM, Brandão AAC, Sousa JBB. Avaliação do uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus Lam*) na terapêutica tópica de feridas. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2007; 28(3):279-286.

21 Maciel E, Serra MC. Fisiologia e Fisiopatologia. Em: Tratado de Queimaduras. São Paulo:Atheneu; 2004.

22 Possa DV, Reis ID, Grecellé CZ, Schons SV. Contribuição ao estudo morfométrico de cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção com óleo de copaíba, em ratos. Salão de Iniciação Científica; 2007 oct 22-25; Ji-Paraná, Brasil. Ji-Paraná: Ciência & Consciência; 2007.

23 Paiva LA, Cunha KMA, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. Phytotherapy. 2002; 16(8):737-739.

24 Brito NMB, Simões MJ, Pessoa AF, Melo MCF. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. Rev. Para. Med. 1999;13(1):12-17.

25 Edelman LS. Social and economic factors associated with the risk of burn injury. Burns. 2007;33:958-965.

26 Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN. State of the art in bum treatment. World J. Surg. 2005; 29:131-148.

27 Projeto Esperança Animal. São Paulo. Acesso em: 2010 Nov 21. Disponível em: <http://www.pea.org.br>.

28 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia funcional e estrutural. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

- 29 Hettiaratchy S, Dziewulski P. Pathophysiology and types of burns. *BMJ*. 2004; 328(7453):1427-1429.
- 30 Ferguson MWJ, Leigh IM. Clinical aspect of wound healing. *Wound healing*. 2005.
- 31 Desanti L. Pathophysiology and current management of bum injury. *ADV Skin wound care*. 2005; 18: 323-332.
- 32 Orgaes FAFS, Lyra MC, Rodrigues Junior OF, Gonella HA. Estudo histopatológico do uso de heparina tópica em queimaduras por escaldos em ratos. *Rev. Soc. Brás. Cir. Plast*. 2007; 22(1): 39-44.
- 33 Mandelbaum SH, Disantis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. *An Bras Dermatol*. 2003; 78(4):393-410.
- 34 Anderson D. Wound management in small animal practice. *In Practice*. 1996; 18: 115-128.
- 35 Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: Uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm*. 2005; 41:27-51.
- 36 Francisco SG. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. *Femina*. 2005; 33(2):89-93.
- 37 Veiga Júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova*. 2005; 28(3):519-528.
- 38 Pinto AC, Braga WF, Rezende CM, Garrido FMS, Veiga Júnior VF, Bergter L, Patitucci ML, Antunes OAC. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* huber ex ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *J. Braz. Chem. Soc*. 2000; 11(4):355-360.
- 39 Pontes AB, Correia DZ, Coutinho MS, Mothé CG. Emulsão dermatológica a base de copaíba. *Rev. Analytica*. 2003; 7:36-42.

- 40 Pinto AA, Rocha IG, Souza Filho MRP, Monteiro TBG, Parron VO, Moreira WG, Pereira ER. Uso de óleo de copaíba no tratamento de escaras em pacientes acamados. *Cienc. Consc.* 2007; 2(1).
- 41 Veiga Júnior VF, Patitucci ML, Pinto AC. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quim. Nova.* 1997; 20(6):612.
- 42 Ramos MFS. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP. 2006:132.
- 43 Paiva LAF, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VSN. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 93(1):51-56.
- 44 Castrilho A, Heras B, Hortelano S, Rodriguez B, Villar A, Bosca L. Inhibition of the nuclear Factor κ B (NF- κ B) pathway by tetracyclic kaurenediterpenes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(19):15854-15860.
- 45 Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry.* 2000; 55(7):773-778.
- 46 Veiga Júnior V, Pinto AC. O Gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova.* 2002; 25(2):273-286.
- 47 Gurung S, Skalko-Basnet N. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: *In vivo* evaluation in mice burn model. *J. Ethnopharmacol.* 2009;121: 338-341.
- 48 Ramsey DT, Pope ER, Wagner Mann C, Berg JN, Swain SF. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *Am. J. vet. Res.* 1995;56(7):941-949.
- 49 Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4^a ed. Carol Stream:Allured Publishing Corporation; 2009.

50 Allen JRL, Popovich HG, Anse HC. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 8ª ed. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

51 Prata MB, Haddad CM, Goldenberg S, Simões MJ, Moura LAR, Trabulsi LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 1988; v.3, n.2, p.43-48.

52 Zar JH. **Biostatistical analysis**. 5th ed. 2008. New Jersey, Prentice Hall.

53 Biavatti MW, Dossin D, Deschamps FC, Lima MP. Análise de óleos resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Rev. bras. Farmacogn*. 2006; 16:230.

54 Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazillian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* . 2008; 120(2): 204-208.

55 Veiga Júnior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J Ethnopharmacol*. 2007; 112(2): 248-254.

56 Jandera V, Hudson DA, Wet PM, Innes PM, Rode H. Cooling the burn wound: evaluation of different modalities. *Burns*. 2000; 26(3): 265-270.

57 Novato DA. Tratamento de ferida uma contribuição ao ensino de enfermagem [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

58 Jaskille AD, Jeng JC, Sokolich JC, Lunsford P, Jordan MH. Repetitive ischemia-reperfusion injury: a plausible mechanism for documented clinical burn-depth progression after thermal injury. *Journal Burn Care*. 2008; 28(1): 13-20.

59 Barbosa E, Moreira EAM, Faintuch J, Pereira MJ. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. *Rev. Nutr*. 2007; 20(6): 693- 702.

- 60 Swain SF, Hinkle SH, Bradley DM, Wound Contraction: Basic and Clinical Factors. *Compendium*. 2001; 23(1):20-34.
- 61 Vieira RC, Bombardiere E, Oliveira JJ, Lino-Júnior RS, Brito LAB & Junqueira-Kipnis A. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesq. Vet. Bras.* 2008; 28:358-366.
- 62 Vorauer-Uhl K, Fürnschli E, Wagner A, Ferko B, Katinger H. Reepithelization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound Rep. Reg.* 2002;10(6):366-371.
- 63 Brito NMB, Simões MJ, Pessoa AF, Melo MCF. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. *Rev. Para. Med.* 1999; 13(1):12-17.
- 64 Paiva LAF, Gurgel LA, Campos AR. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy*. 2002; 16(8):737-739.
- 65 Eurides D, Mazzanti A, Gonçalves GF, Belletti ME, Silva LAF, Fioravanti MCS, Chaves NST, Bombonato PP, Campos VA, Ogata AS. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). *Vet. Not.* 1998; 4:77-82.
- 66 Estevão LRM, Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratellaevêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesq. Agropec.Bras.* 2009; 44(4): 406-412.
- 67 Souza Júnior OG, Guimarães Neto HP, Pinto NT, Santos MT, Carvalho RA. Achados macroscópicos na cavidade peritoneal de ratos após aplicação do óleo de copaíba. *Rev. para. med.* 2002; 16(1):14-18.
- 68 Cavalcanti Neto AT, Arruda TEP, Arruda TTP, Pereira SLS, Turatti E. Comparative evaluation between copaiba oil-resin and chlorhexidine digluconate on wound healing. Histological study in rats. *Rev Odontol UNESP.* 2005; 34(2): 107-112.

69 Pereira FJ, Martins FT, Correa RS, Moreira MEC, Costa AMDD, Dos Santos MH, Polo M, Barbosa LCA. Isolamento, composição química e atividade antiinflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. Lat. Am. J. Pharm. 2008; **27** (3): 369-74.

APENDICES

Apêndice I - Área da queimadura (mm²) do grupo controle ao longo do experimento.

ANIMAL	ÁREA DA QUEIMADURA (mm ²)				
	GRUPO CONTROLE - DIA				
	3	7	14	21	30
I	369,96	362,67	141,51	108,03	18,96
II	339,12	382,59	113,71	53,36	22,99
III	277,95	305,35	70,93	22,92	17,27
IV	402,15	451,17	142,38	53,61	10,91
V	649,25	657,88	494,57	18,35	14,01
VI	567,6	604,04	240,43	48,46	12,05
VII	409,44	439,04	205,68	94,74	24,34
VIII	522	447,25	125,6	19,42	4,68

Apêndice II - Área da queimadura (mm^2) do grupo placebo ao longo do experimento.

ANIMAL	ÁREA DA QUEIMADURA (mm^2)				
	GRUPO PLACEBO - DIA				
	3	7	14	21	30
I	702,43	622,3	198,47	56,19	9,67
II	404,57	308,04	145,01	57,79	21,05
III	479,5	485,67	263,93	104,35	13,78
IV	655,05	476,31	253,24	94,01	10,59
V	443,81	585,59	209,38	24,26	5,48
VI	380,97	297,6	128,93	40,8	19,1
VII	272,99	360,59	99,98	23,36	16,6
VIII	558,33	577,92	102,55	29,25	14,8

Apêndice III - Área da queimadura (mm^2) do grupo óleo de copaíba ao longo do experimento.

ANIMAL	ÁREA DA QUEIMADURA (mm^2)				
	GRUPO OLEO DE COPAIBA - DIA				
	3	7	14	21	30
I	387,11	431,29	110,92	39,97	10,06
II	427,23	334,37	62,68	17,96	0
III	517,61	342,68	131,51	32,11	0
IV	383,82	237,46	155,39	24,56	9,6
V	522,69	550,69	205,39	13,3	0
VI	447,27	437,25	111,88	18,83	9,4
VII	853,42	813,1	46,04	10,26	0
VIII	480,86	393,73	112,02	22,66	0

ANEXOS

Anexo A - Logaritmo da área da queimadura do grupo controle ao longo do experimento.

ANIMAL	LOGARITMO DA ÁREA DA QUEIMADURA				
	GRUPO CONTROLE - DIA				
	3	7	14	21	30
I	2,569327	2,560707	2,153845	2,037546	1,300161
II	2,531632	2,583867	2,059601	1,735279	1,38003
III	2,445526	2,486218	1,85691	1,378761	1,261739
IV	2,605467	2,655302	2,156489	1,737272	1,075912
V	2,81308	2,818806	2,695105	1,286681	1,176381
VI	2,754807	2,781784	2,382791	1,694254	1,115611
VII	2,61325	2,643492	2,315298	1,981093	1,403807
VIII	2,718502	2,65152	2,102434	1,310056	0,754348

Anexo B - Logaritmo da área da queimadura do grupo placebo ao longo do experimento.

ANIMAL	LOGARITMO DA ÁREA DA QUEIMADURA				
	GRUPO PLACEBO - DIA				
	3	7	14	21	30
I	2,847221	2,794697	2,299878	1,75732	1,028164
II	2,608066	2,490015	2,164383	1,769303	1,343409
III	2,681693	2,687235	2,423131	2,022635	1,169674
IV	2,816937	2,678801	2,405244	1,977769	1,064083
V	2,648175	2,768335	2,323004	1,402433	0,811575
VI	2,582029	2,47509	2,113709	1,621176	1,303196
VII	2,437735	2,558216	2,004235	1,386677	1,245513
VIII	2,747668	2,762619	2,01515	1,480725	1,198657

Anexo C - Logaritmo da área da queimadura do grupo óleo de copaíba ao longo do experimento.

ANIMAL	LOGARITMO DA ÁREA DA QUEIMADURA				
	GRUPO OLEO DE COPAIBA - DIA				
	3	7	14	21	30
I	2,588955	2,635775	2,048908	1,612466	1,043755
II	2,631677	2,525524	1,804003	1,277838	0
III	2,714841	2,536154	2,122249	1,519959	0
IV	2,585258	2,377416	2,194209	1,407561	1,025306
V	2,719074	2,741695	2,314689	1,155336	0
VI	2,65154	2,641722	2,052617	1,297323	1,017033
VII	2,931671	2,910678	1,672467	1,051538	0
VIII	2,682921	2,5963	2,053155	1,374015	0