

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NAS CELULAS ESPERMÁTICAS DE RATOS *WISTAR*

**PEDRO SICA CRUZEIRO¹; CARLOS EDUARDO RANQUETAT FERREIRA²;
MARIANA TEIXEIRA TILLMANN³; SAMUEL FELIX³; MÁRCIA DE OLIVEIRA
NOBRE³; CARINE DAHL CORCINI².**

¹ Curso de Biotecnologia; ² Laboratório de Reprodução Animal – REPROPel, ³ Clinpet, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000, Capão do Leão, RS – Brasil –
¹cruzeiropedro@hotmail.com, ²c_ranquetat@hotmail.com,
³mariana.teixeira.tillmann@gmail.com, ³samuelf@gmail.com, ³marciaonobre@gmail.com,
²corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento empírico sobre a utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana (CORDEIRO, 2005). Nesse contexto, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico, sendo utilizado no tratamento de doenças, porém alguns sem comprovação científica de seus benefícios.

No Brasil, o fitoterápico óleo de copaíba tem sido utilizado para diversos fins em terapias medicinais. Segundo Francisco (2005) o óleo de copaíba é extraído de árvores comuns a América Latina e África Ocidental, sendo encontrados no Brasil nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica, são do gênero *Capaifera*, da família Fabaceae-Caesalpinioideae. Tais plantas podem viver até 400 anos, atingindo a altura entre 25 e 40 metros, diâmetro entre 0,4 e 4 metros; possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem. As sementes são pretas e ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos.

A origem do nome é indígena, e seu uso veio pela observação dos animais que se esfregavam no tronco da árvore para cicatrizar seus ferimentos, e pelos índios que tratavam o coto umbilical de seus filhos. Sua indicação fitoterápica tem várias finalidades, como antiinflamatória, anti-reumática, anticancerígena, inflamação ginecológica e, principalmente, cicatrizante de úlceras e feridas em geral (FRANCISCO, 2005). Apesar da existência de estudos da ação terapêutica do óleo-resina de copaíba, os estudos de toxicidade deste produto são escassos na literatura científica; alguns destes estudos obtiveram resultados contraditórios (SACHETTI et. al, 2009).

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito do óleo de copaíba nas células espermáticas após ser administrada em solução de ação tópica em ratos *Wistar*.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado com 48 animais da espécie *rattus norvegicus* da linhagem Wistar alojados no biotério central da UFPEL, o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA- Processo 7605) e os animais foram mantidos em condições de bem estar durante todo o período experimental. Foram causadas lesões na pele destes animais, os quais estavam em plano anestésico no momento do procedimento, e após receberam aplicações tópicas de extrato de copaíba nas concentrações de 0,1% e 0,01%, vaselina e solução fisiológica por 21 dias. Após realizou-se o procedimento de eutanásia de acordo com a resolução de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Para avaliação de possíveis efeitos nos espermatozoides coletou-se o epidídimo e ducto deferente, que foram colocados em solução tampão de fosfato (PBS) 1X, realizando-se cortes dos mesmos para exposição das células espermáticas, sendo incubados por 10 minutos a 37°C. Em seguida realizaram-se as análises de integridade de membrana espermática por microscopia de fluorescência, com uso de sondas de iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína, conforme descrito por HARRISON & VICKERS (1990). As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas integras, enquanto as que apresentavam coloração vermelha foram consideradas danificadas. O DNA foi avaliado pela exposição ao corante Acridine Orange. A integridade de acrossoma foi avaliada conforme (KAWAMOTO et al. 1999), sendo confeccionados esfregaços com 20 µL sêmen em lâmina. Posteriormente, foram adicionados 20µL de *Lectin from Arachis hypogaea FITC Conjugate* aguardando por 10 minutos antes da leitura. As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência, com filtro WU, excitações de 450-490nm e emissão de 520nm. Células espermáticas com morfologia normal e coradas em verde foram consideradas íntegras. Quando o acrossoma apresentava morfologia alterada, ou não apresentava a coloração verde considerava-se como acrossoma danificado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de copaíba em qualquer concentração interfere negativamente na integridade acrossomal da célula espermática de ratos após o tratamento tópico por 21 dias conforme Tabela 1. A composição do extrato de copaíba contém proximadamente 72 hidrocarbonetos e 28 ácidos carboxílicos, sendo o óleo composto por 50% de cada tipo de terpenos (MACIEL et al., 2002) desta forma pode-se atribuir uma redução na qualidade acrossomal devido a ocorrência destes ácidos do óleo afetando a composição lipídica da membrana acrossomal e aumentando a fluidez da membrana (SWAPNA et al., 2006).

Concentrações iguais ou maiores a 0,1% de copaíba induzem à danos no DNA dos espermatozoides, indo de encontro aos dados encontrados por CAVALCANTI et al., (2006) que ao analisar o potencial genotóxico, atribuiu ao ácido caurenóico, efeitos antiinflamatórios, citotóxico, entre outros, e comprovou que este ácido não induziu significativamente danos elevados ao DNA das células.

Tabela 1- Média (\pm erro padrão) para integridade de acrossoma, DNA e membrana da célula espermática de ratos wistar submetidos ao tratamento tópico com extrato de copaíba por 21 dias (n= 12 animais por tratamento).

Tratamento	Acrossoma (%)	DNA (%)	Membrana (%)
Solução Salina	82,1 \pm 2,8 ^a	99,9 \pm 0,1 ^a	57,9 \pm 5,0 ^a
Vaselina	76,8 \pm 2,8 ^a	96,4 \pm 1,5 ^a	29,3 \pm 3,8 ^b
Copaíba 0,1%	50,4 \pm 7,0 ^b	80,0 \pm 6,5 ^b	51,9 \pm 4,4 ^a
Copaíba 0,01%	40,8 \pm 6,0 ^b	95,9 \pm 1,4 ^a	31,2 \pm 3,5 ^b

Letras diferentes na mesma coluna representa diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso tópico de óleo de copaíba a 0,1% e 0,01% causa efeitos negativos nas células espermáticas dos ratos *Wistar*, por causar danos no acrossoma, DNA e integridade de membrana, demonstrando que maiores estudos precisam ser realizados para determinar a toxicidade desta planta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTI, B.C.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.; RAO, V.S.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.; PESSOA C. **Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil.** Food and chemical toxicology, Fortaleza, v.44, n.3, p.388-392, 2006.

CORDEIRO, C.H.G. **Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v.15, n.3, p.272-278, 2005.

FRANCISCO, S.G. **Uso do óleo de resina de Copaíba (*Copaifera Officinalis L*) em inflamação ginecológica.** Revista Femina, Rio de Janeiro, v.33, n.3, p.89-93, 2005.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. **Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.** Journal Reproduction and Fertility, Babraham, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. **Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status.** Fertility and Sterility, Suita, v.71, n.3, p.497-501, 1999.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C.; JR. V.; F.V. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, São Paulo, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

SWAPNA, I.; KUMAR, K.V.S.S.; MURTHY, C.R.K.; SENTHILKUMARAN, B., **Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during acute ammonia intoxication.** NeuroToxicology, Hyderabad, v.27, N.3, p.402-408, 2006