

LÍGIA REIS DE MOURA ESTEVÃO

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE RETALHOS
CUTÂNEOS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) TRATADOS COM
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)**

RECIFE

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

LÍGIA REIS DE MOURA ESTEVÃO

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE RETALHOS
CUTÂNEOS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) TRATADOS COM
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadoras:

Profª. Dra. Márcia Valéria Rizzo Scognamillo-Szabó

Profª. Dra. Liriane Baratella Evêncio

RECIFE

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE RETALHOS
CUTÂNEOS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) TRATADOS COM
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)**

Dissertação de Mestrado elaborada por

LÍGIA REIS DE MOURA ESTEVÃO

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Profª. Dra. Liriane Baratella Evêncio
Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Alessandro César Jacinto da Silva
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Profª. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Departamento de Medicina Veterinária

*Ao meu amado esposo Alexandre e
aos meus filhos queridos Pedro
Henrique e Nathália, minhas mais
preciosas riquezas, dedico este
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

Ao meu esposo Alexandre e aos meus filhos Pedro Henrique e Nathália, pelo apoio, incentivo, paciência e carinho durante toda a execução do trabalho.

A todos os meus familiares que direta ou indiretamente sempre me apoiaram, em especial ao meu pai, Edmundo de Moura Estevão e minha mãe, Sônia Reis Estevão, excelentes pais e amigos de todas as horas.

Ao Prof. Joaquim Evêncio Neto, a quem muito admiro por sua sabedoria, experiência e bondade, o meu eterno agradecimento por me aceitar como orientada e pelo apoio científico, dedicação e carinho para a realização deste trabalho.

A todos os colegas que muito me ajudaram durante o período do experimento. Em especial, as amigas Juliana Pinto de Medeiros, Maria Goretti Soares e Cristiane Prazeres e ao amigo Wagner Souza, que dedicaram valiosas horas na realização deste trabalho.

Aos Professores Flávio Cardoso de Carvalho, Ednaldo Guimarães, Marcelo Tavares, Regildo Márcio Gonçalves da Silva, Liriane Baratella Evêncio, Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho, Cláudio Augusto Gomes da Câmara e José Vitor Moreira L. Filho, que me ajudaram desde o início do experimento, engrandecendo e valorizando a pesquisa.

A Márcia Valéria Rizzo Scognamillo-Szabó, agradeço pelos ensinamentos e pela oportunidade que me deu durante o início do mestrado.

Ao CNPq, pelo importante suporte financeiro cedido para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários desta instituição, em especial a secretária do Programa de Pós-graduação, Edna Chérias, as bibliotecárias, Waldetrudes P. Jansen e Ana Katarina, e ao responsável técnico pelo biotério, André, pelo apoio e dedicação voltado aos alunos, funcionários e, principalmente, aos professores.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*) TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)

RESUMO

O insucesso de retalhos cutâneos devido à necrose total ou parcial não é um fato isolado. Várias pesquisas que utilizaram recursos farmacológicos e não farmacológicos foram realizadas para aumentar a viabilidade destes. O óleo de copaíba tem sido utilizado em vários modelos experimentais como cicatrizante de feridas. No entanto, não foram encontrados relatos sobre a utilização deste óleo na viabilidade de retalhos cutâneos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). Trinta ratos Wistar foram distribuídos em três grupos: controle absoluto (GCA), controle (GC) e tratado (GT). Os ratos de todos os grupos foram submetidos à cirurgia de retalho cutâneo dorsal e avaliados por oito dias de pós-operatório. Os animais do GCA não receberam tratamento pós-operatório, enquanto os animais do grupo GC receberam tratamento tópico com pomada contendo apenas o veículo (vaselina e glicerina) e os animais do grupo GT foram tratados com óleo de copaíba em pomada a 10%, utilizando vaselina e glicerina como veículo. No oitavo dia de pós-operatório os animais foram ortonasiados e foram coletados fragmentos das porções cranial, média e caudal do retalho cutâneo para análise histopatológica. As análises de variância mostraram-se significativas ($p < 0,05$) para área de necrose (GCA > GC e GT), número de vasos sanguíneos nas partes média e caudal (GT > GCA e GC), número de leucócitos nas partes cranial (GT > GC e GCA), média (GT e GC > GCA) e parte caudal (GT > GC > GCA), número de fibroblastos nas partes média (GT e GC > GCA) e caudal (GT > GC e GCA). Não houve diferença significativa entre os grupos na contagem de vasos sanguíneos e fibroblastos na parte cranial e para fibras colágenas em todas as partes ($p > 0,05$). Baseado nestes resultados conclui-se que o óleo de copaíba testado foi eficiente na viabilização do retalho cutâneo randômico em ratos, favorecendo o processo de reparação tecidual.

Palavras-chave: Retalhos cirúrgicos, *Copaifera*, isquemia, pele.

**MORFOLOGIC AND MORFOMETRIC ASPECTS OF SKIN FLAPS IN
RATS (*Rattus norvegicus albinus*) TREATED WITH COPAIBA
OILRESIN (*Copaifera langsdorffii*)**

ABSTRAC

Flap failure related to total or partial necrosis isn't a rare event. Some research using pharmacological and not pharmacological resources has been carried through to increase the viability of these. The copaiba oleoresin has been used in some experimental models such as healing of wounds. However, there aren't reports about the use of this oil in the improvement of the viability of skin flaps. The aim of this study was to evaluate the morphologic and morphometric aspects of random skin flaps in rats treated with copaiba oilresin (*Copaifera langsdorffii*). Thirty Wistar rats were divided into three groups: control group (GC), absolute control group (GCA) and treated group (GT). The animals were submitted to dorsal random skin flaps surgery and received post-operative treatment during eight days. The GC group was received topical treatment with only vehicle (glycerin and petroleum jelly). The GT group was treated with 10% copaiba oilresin in the same vehicle and the GCA didn't receive any treatment. In the eighth day of post-operative animals were orthotomized and fragments were collected from cranial, medial and caudal portions of the skin flap for the histopathological analysis. Analyses of variance showed a significance ($p < 0.05$) for area of necrosis (GCA > GC and GT), number of blood vessels in the medial and caudal portions (GT > GCA and GC), number of leukocytes in the cranial GT > GC & GCA), medial (GT and GC > GCA), and caudal portion, GC (GT >> GCA), number of fibroblasts in medial (GT and GC > GCA) and caudal areas (GT > GC & GCA). There wasn't statistical significance between groups in the counting of blood vessels and number of fibroblasts at the cranial portion and the collagen fibers in all parts ($p > 0.05$). Based on these results it is concluded that the Copaiba oil treatment was effective in the enabling of the random rats skin flaps encouraging these procedure to the repair of tissues.

Key words: Surgical flaps, *Copaifera*, Ischemia, Skin

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1- Fotografia da árvore do gênero Copaifera L.	14
Figura 2- Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo Controle Absoluto (GCA) no oitavo dia de PO. Observar aspecto escuro da área necrosada (setas)	31
Figura 3- Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo Controle (GC) no oitavo dia de PO. Observar aspecto escuro da área necrosada (setas).....	31
Figura 4- Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo tratado (GT) no oitavo dia de PO. Observar aspecto amarelado da área necrótica (setas).....	31
Figura 5- Teste de Tukey para médias das áreas necrosadas. (médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%)	32
Figura 6- Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção caudal. Observar presença de vasos sanguíneos (setas longas), infiltrado leucocitário (setas curtas) e células musculares (M). Coloração H.E. Aum. (barra 20 µm).....	35
Figura 7- Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção caudal. Observar presença de células em processo de necrose (setas longas), células musculares (M) e poucos vasos (setas curtas). Coloração H.E. Aumento (barra 20 µm).....	35
Figura 8- Fotomicrografia da parte do retalho cutâneo do animal do GCA porção caudal. Observar área necrosada (seta branca), células em processo de necrose (setas longas), células musculares (M) e poucos vasos sanguíneos (seta curta). Coloração H.E. Aumento (barra 50 µm).....	35
Figura 9- Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção média. Observar presença de vasos sanguíneos (setas longas) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 20 µm)	36

Figura 10-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção média. Observar presença de infiltrado leucocitário (IF) e poucos vasos sanguíneos (setas). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).....	36
Figura 11-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GCA porção média. Observar área necrosada (setas longas) e presença de infiltrado leucocitário (IF). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).....	36
Figura 12-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção cranial. Observar a pele íntegra, com presença da epiderme (seta longa), folículos pilosos (setas curtas), glândulas sebáceas (GS) e células adiposas (A). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).....	37
Figura 13-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção cranial. Observar a pele íntegra, com presença da epiderme (seta longa), folículos pilosos (setas curtas), glândulas sebáceas (GS) e células adiposas (A). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).....	37
Figura 14-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção cranial. Observar a derme íntegra, vasos sanguíneos (setas), fibras colágenas (FC), células adiposas (A) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).....	37
Figura 15-	Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção cranial. Observar a derme íntegra, fibras colágenas (FC), células adiposas (A) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 50 μm).....	37
Figura 16-	Cromatograma do óleo de copaíba testado	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Média de fibras colágenas do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados.....	32
Tabela 2- Média de vasos sanguíneos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados.....	33
Tabela 3- Média de leucócitos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados.....	33
Tabela 4- Média de fibroblastos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados.....	33
Tabela 5- Composição química do óleo de copaíba testado	39

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO.....	11
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1- <i>Copaifera L.....</i>	13
2.2- O Processo cicatricial.....	19
2.3- Retalhos cutâneos.....	20
2.4- Fitoterápicos e princípios de manipulação de pomadas.....	23
3- OBJETIVOS.....	24
3.1- Objetivo geral.....	24
3.2- Objetivos específicos.....	24
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1- Animais e local.....	25
4.2- Grupos experimentais	25
4.3- Aquisição do óleo.....	25
4.4- Análise química do óleo de copaíba comercial.....	26
4.5- Análise microbiológica.....	27
4.6- Preparo das formulações	27
4.7 - Cirurgia para execução do retalho cutâneo dorsal.....	27
4.8- Tratamento pós-operatório do retalho cutâneo dorsal.....	28
4.9- Coleta e processamento do material.....	28
4.10- Delineamento e Análise Estatística	29
5- RESULTADOS.....	30
6- DISCUSSÃO.....	40
7- CONCLUSÃO.....	44
8- REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O homem tem utilizado plantas medicinais como cicatrizante desde a antiguidade. Ainda hoje plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados públicos e encontradas em quintais. Muitas destas são utilizadas para estimular a angiogênese e auxiliar a cicatrização. Entretanto, apesar das observações populares contribuírem de forma relevante para a divulgação dos efeitos medicinais dos vegetais, seus princípios ativos e mecanismo de ação e toxicidade são pouco conhecidos (SECCO, 1990; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

O óleo de copaíba, extraído de árvores do gênero *Copaifera*, da família Leguminosae-Caesalpinioideae é uma substância que tem assumido grande importância na Medicina Natural Brasileira. Sua ação cicatrizante e antiinflamatória tem sido pesquisada em vários modelos experimentais, demonstrando ser este capaz de aumentar o tecido de granulação e a angiogênese em processos cicatriciais (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Em 1996, Brito estudou os aspectos morfológicos e morfométricos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos, tratados com óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*). Observou aumento da crosta da lesão, do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, com diminuição do número de fibras colágenas. O óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*) possui a capacidade de reduzir o tempo de reparação tecidual em feridas cutâneas em ratos (EURIDES *et al.*, 1998), reduz a formação de tecido de granulação (BASILE *et al.*, 1988) além de possuir propriedades antiinflamatórias e analgésicas (FERNANDES; PEREIRA; PAULO, 1992). Paiva (2002) demonstrou ser a *Copaifera langsdorffii*, na concentração de 4%, capaz de acelerar a contração de feridas abertas em ratos.

O reparo de lesões do sistema tegumentar com perda de substâncias após traumatismo, ressecção tumoral, infecção ou isquemia tecidual envolve o uso de retalhos cutâneos (ALMEIDA *et al.*, 2004). Na medicina veterinária a cirurgia plástica e reconstrutiva lidam com o reparo dos defeitos e malformações de natureza congênita ou adquirida onde os retalhos cutâneos exercem papel fundamental nesta área. A vitalidade dos retalhos de pele e a incorporação dos retalhos cutâneos são fundamentais para o sucesso terapêutico de técnicas reconstrutivas. A evolução positiva depende do suporte vascular do leito receptor, do pedículo vascular dominante do retalho e de alterações locais tais como: resposta inflamatória e/ou

processo de cicatrização e as sistêmicas, ou seja, resposta metabólica ao trauma (PAVLETIC, 1998).

De acordo com Chen, Perim e Maracajá (1982), o tempo para formação do pedículo secundário em ratos após a confecção do retalho cutâneo, ocorre em torno de nove dias. A formação de hematoma, edema e a relação pedículo versus área do pedículo podem acarretar necrose da porção distal do retalho que variam de 9% a 65% de acordo com o modelo experimental testado.

A utilização do retalho cutâneo associado a recursos farmacológicos potencializa o sucesso desta técnica. O uso de substâncias que estimulam a angiogênese é comumente empregado. Dentre os recursos farmacológicos podemos citar estudos que utilizaram drogas vasodilatadoras, vasoativas, bloqueadoras de canais de cálcio e antioxidantes (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005). Substâncias como buflomedil, eritropoetina humana, nicotina, hialuronidase, hidralasina, pentoxifilina e o dimetil sulfóxido, foram estudados (CAMPOS *et al.*, 2001, ACEVEDO-BOCADO *et al.*, 2001; BUEMI *et al.*, 2002; HUEMER, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Outros estudos avaliaram os efeitos de alguns recursos não-farmacológicos como a estimulação elétrica nervosa transcutânea (KJARTANSSON, 1988; ATALAY *et al.*, 2003; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2005), a eletroacupuntura (TABOSA *et al.*, 2003), e o laser de baixa potência (BALDAN, 2005). O fitoterápico Ginkgo Biloba (EGB) foi pesquisado por Souza Filho *et al.* (2002).

Apesar de haver várias pesquisas envolvendo óleo de copaíba e cicatrização (FERNANDES *et al.*, 1992; BRITO *et al.*, 1996; EURIDES *et al.*, 1998) não foram encontrados relatos na literatura sobre o uso deste óleo, como fitoterápico, na melhora da viabilidade de retalhos cutâneos.

Baseando-se em resultados positivos com o óleo de copaíba em vários modelos de cicatrização, somando-se à necessidade de recursos terapêuticos na melhora da viabilidade do retalho cutâneo, este trabalho visa avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos de retalhos cutâneos dorsais randômicos em ratos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em pomada, na concentração de 10%.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- *Copaifera* L.

As copaíbas são árvores do gênero *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae), que exudam do seu tronco um óleo resinoso chamado óleo de copaíba. Conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; LEITE 2004).

Descobertas e utilizadas pelos índios, foram citadas pela primeira vez pelo nome de “copei” em informe de Petrus Martius ao Papa Léon X, publicado em Estrasburgo, 1534. O remédio “cupahyba”, mencionado em 1625 por um monge português que escreveu sobre o Brasil, era usado por índios da Amazônia como agente cicatrizante e antitetânico quando aplicado sobre o umbigo de recém-nascidos (BRITO, 1996; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O conhecimento das propriedades medicinais deste óleo pelos índios adveio da observação de que animais feridos esfregavam-se no tronco das copaibeiras para cicatrizar suas feridas (SALVADOR, 1975; SAMPAIO, 2000).

O gênero *Copaifera* possui 72 espécies, nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental, sendo que dezesseis destas são encontradas somente no Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. encontrada no norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador, *C. guianensis* Desf., nas Guianas, *C. reticulata* Ducke e *C. multijuga* Hayne no estado do Amazonas, *C. confertiflora* Bth no Piauí, *C. langsdorfii* Desf. no Brasil, Argentina e Paraguai, *C. coriacea* Mart. na Bahia, *C. cearensis* Huber ex Ducke no Ceará. (INDEX KEWENSIS, 1996).

A *C. langsdorfii* é particularmente importante por estar distribuída por todo território brasileiro desde a Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-oeste. Possui quatro diferentes variedades: *C. langsdorfii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As copaibeiras (Fig. 1) são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorida. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares. Em plantios, sua floração e

frutificação ocorrem a partir dos cinco anos de idade (VAN DEN BERG, 1982; LEITE, 2004).

O óleo de copaíba é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Segundo Alencar (1988), este óleo-resina resulta da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias. É um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Os óleos mais escuros e viscosos são os preferidos para a utilização farmacológica. Somente na espécie *C. langsdorfii* o óleo pode apresenta-se vermelho, recebendo a denominação popular de copaíba vermelha (MATTOS FILHO *et al.*, 1993).



Figura 1- Fotografia da árvore do gênero *Copaifera* L.

Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006), avaliaram a melhor época do ano para a coleta do óleo-resina de copaíba no Pará, Brasil. Concluíram que as produções de óleo de copaíba ocorrem com maior abundância no período de menor precipitação pluviométrica com alterações nas concentrações de sesquiterpenos dependendo da espécie estudada.

Na literatura encontram-se várias utilizações deste óleo na medicina tradicional, tendo indicação para diversas enfermidades. Nas vias urinárias como anti-blenorrágico, antiinflamatório, anti-gonorreico, antisséptico, no tratamento da cistite, como estimulante, na

incontinência urinária e sífilis. Nas vias respiratórias, como antiinflamatório, para asma, bronquite, como expectorante, na inflamação de garganta, hemoptise, pneumonia, sinusite. Na pele, em casos de dermatite, eczema, psoríase e como cicatrizante de feridas. Outras utilizações são conhecidas, como: afrodisíaco, antitetânico, anti-reumático, anti-herpético, anticancerígeno, no tratamento da leishmaniose, leucorréia, contra paralisia, dores de cabeça, picada de cobra (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). Este tem sido administrado oralmente e por aplicações tópicas do óleo *in natura* ou em pomada (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2001).

Devido ao grande número de indicações medicinais, o óleo de copaíba já foi considerado a verdadeira panacéia. Entretanto, após a descoberta, de agentes terapêuticos sintéticos mais eficientes, como a penicilina, sua utilização diminuiu bastante, inclusive como cicatrizante (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O retorno à terapêutica natural nos últimos anos trouxe de volta os fitoterápicos para as farmácias de todo o país, mas, segundo Veiga Junior e Pinto (2002), o conhecimento de sua utilização e suas aplicações se perdeu, ou aparecem bastantes confusos nas centenas de publicações que não apresentam mais que duas ou três propriedades farmacológicas já bastante conhecidas.

Apesar de suas variadas aplicações terapêuticas na medicina popular os estudos farmacológicos descritos até o momento para estes óleos são muito reduzidos. A grande maioria não indica a espécie de onde o óleo foi extraído, nem informa a época e o local de coleta, fazendo menção apenas ao óleo de copaíba comercial. Sem estes dados não se pode ter certeza da autenticidade destes óleos uma vez que, estudos por cromatografia gasosa de alta resolução de dezesseis diferentes tipos de óleo de copaíba comerciais mostraram que, em grande parte, óleos de copaíba de diferentes espécies são misturados (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). Também foi comprovada adulteração, possivelmente, com óleo de soja (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Além disso, estudos etnobotânicos relacionados aos óleos de copaíba relatam que nem todas as árvores exudam óleos apropriados para o uso medicinal (BASILE *et al.*, 1988; LEITE, 2004).

O órgão de regulamentação de drogas e alimentos do governo americano Food and Drug Administration (FDA), aprovou o óleo de copaíba em 1972. Testes de irritação e sensibilização do óleo de copaíba foram realizados com 25 voluntários e não se observaram reações adversas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Entre as propriedades medicinais dos óleos de copaíba a mais estudada foi a antiinflamatória. Basile *et al.* (1988), estudaram a atividade antiinflamatória do óleo em ratos

utilizando diversos modelos. Observaram inibição de edema induzido por carregenina, inibição de formação de granuloma “Cotton-pellet” e aumento de permeabilidade vascular. Seus resultados indicam que o óleo de copaíba possui atividade antiinflamatória e baixa toxicidade. Seu uso é justificado na medicina popular, apesar dos efeitos adversos resultantes de altas doses do óleo como irritação gastrointestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central.

Fernandes *et al.* (1992), estudaram o efeito analgésico e antiinflamatório dos óleos de *Copaifera cearensis*, comparado-os com os da indometacina e com o de alguns derivados isolados de óleos de copaíba como o ácido copálico, o éster metílico do ácido solidago e bisabolol. Os resultados do estudo indicam que o óleo possui atividades antiinflamatórias e analgésicas maiores do que aquelas dos três compostos estudados isoladamente, porém menores que as da indometacina.

As propriedades cicatrizantes em feridas e úlceras, uma das principais indicações dos óleos de copaíba, foram estudadas por alguns autores. Nos experimentos realizados por Paiva *et al.* (2004), o óleo mostrou-se bastante ativo nos ratos em modelos de ferida aberta, resistência à tensão e úlcera crônica de estômago, produzida por ácido acético. Em 1996, Brito estudou os aspectos morfológicos e morfométricos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos, tratados com óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*). Observou aumento da crosta da lesão, do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, com diminuição do número de fibras colágenas. Segundo Eurides *et al.* (1998), as feridas cutâneas dos animais tratados com o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) quando comparadas as do grupo controle, apresentaram maior formação de tecidos de granulação, fibras colágenas e tecidos conjuntivos fibrosos a partir do 7º dia de pós-operatório. A fração do óleo que contém hidrocarbonetos possui maior atividade antiinflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos, segundo estudos realizados com diversos óleos de copaíba comerciais e de *Copaifera multijuga* (DENYER *et al.*, 1994).

O óleo resina de árvores da espécie *Copaifera langsdorffii*, aplicado topicamente na concentração de 4% foi capaz de acelerar a contração de feridas abertas em ratos, avaliadas no 9º dia após a indução da ferida (PAIVA, 2002).

Brito *et al.* (2000) observaram que o óleo de copaíba (*C. reticulata*) promoveu espessamento do epitélio do colo uterino em ratas ooforectomizadas, traduzidos pelo aumento do número de camadas de células no epitélio em relação ao grupo controle.

Óleos de copaíba comerciais apresentaram atividades de proteção contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni*, e como cercaricida e repelente de insetos. Também apresentam atividades antimicrobianas e antibacterianas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A atividade gastroprotetora do óleo de *Copaifera langsdorfii* foi avaliada em lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Ratos pré-tratados com o óleo desta copaíba foram protegidos em doses a partir de 400 mg/kg. Os resultados obtidos sugerem que a ação deste óleo se deve à diminuição de acidez gástrica dada, provavelmente, pela promoção da secreção de muco gástrico e bicarbonato (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Brito *et al.* (2000) pesquisaram o efeito do óleo de copaíba em fígados de ratos após administração por gavagem deste óleo nas dosagens de 0,63ml/kg e 0,06ml/kg. Os resultados obtidos microscopicamente demonstraram não haver alterações hepatocelulares, no entanto, as doses foram capazes de promover congestão vascular no fígado de ratos, sugerindo serem dose dependente.

Estudo recente utilizando o óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) com objetivo de proteger e diminuir a lesão causada pela síndrome de isquemia e reperfusão demonstrou que este óleo, quando administrado por gavagem por sete dias antes da cirurgia, não foi capaz de alterar níveis séricos de aminotransferases em ratos (ARAUJO JUNIOR *et al.*, 2005).

Vários trabalhos foram realizados para se avaliar as atividades anti-tumorais dos óleos de copaíba. A atividade anti-tumoral dos óleos de *C. multijuga* tem sido estudada *in vivo* e *in vitro* e têm-se observado que, após a administração oral deste óleo em ratos, obteve-se a inibição do crescimento do melanoma murino B16F10 com redução da formação dos nódulos de metástase no tecido pulmonar (LIMA *et al.*, 2003). Experimentos de viabilidade celular, realizados *in vitro* com este mesmo óleo, mostram uma significativa redução no número de células de melanoma viáveis. O óleo de *Copaifera multijuga* mostrou-se também com potente atividade antitumoral tempo e dose dependente em ensaios contra células de mastocitoma murino P815 (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Tem-se pesquisado intensamente a utilização do óleo de copaíba também na odontologia (PINHEIRO, 1993, BANDEIRA *et al.*, 1999). Bandeira *et al.* (1999) estudaram a composição do óleo essencial separadamente da resina do óleo de *Copaifera multijuga* e sua compatibilidade biológica em molares de rato, associados ao hidróxido de cálcio como veículo. Também investigaram as atividades bactericida e bacteriostática das duas frações frente ao óleo bruto. Mostraram que o óleo de *Copaifera multijuga* tem maior atividade

bactericida e bacteriostática frente ao *Streptococcus mutans*, enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida e a resina apresentou-se apenas bacteriostática. Simões (2004) observou que a *Copaifera multijuga* possui potencial para controle de *Streptococcus* sp, podendo ser utilizada na odontologia.

A composição química e as propriedades farmacológicas de óleos-resina provenientes de várias espécies de copaíba são diferentes. De maneira geral, as características genéticas, condições edáficas e época do ano são consideradas como fonte de variação na produção, na proporção de indivíduos produtivos e em suas características físico-químicas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Estas variações podem dificultar a generalização da dosagem de uso dos fitoterápicos formulados à base de óleos de copaíba.

A composição química pode ser definida utilizando técnicas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa de alta resolução (TAPPIN *et al.*, 2004). Tappin *et al.* (2004) trabalhou com óleos comerciais do Amazonas e constatou serem estes constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles como β -bisaboleno e β -cariofileno, e de diterpenos. A concentração e a natureza dos sesquiterpenos e diterpenos podem variar, mas somente estas duas classes de produtos naturais, devem estar sempre presentes nos óleos de copaíba (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). O β -bisaboleno possui propriedades antiinflamatórias e analgésicas e o β -cariofileno é descrito por apresentar ações anti-edêmicas, antiinflamatórias e insentífugas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O perfil cromatográfico do óleo de *Copaifera multijuga* define dois grupos de substâncias em regiões bem distintas: hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Barreto Junior *et al.* (2005) utilizaram a técnica de cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba e identificaram os seguintes ácidos diterpênicos: copálico, colavênico, 3 β -hidróxi-copálico, agático e 3 β -acetóxi-copálico. O ácido Kaurenóico foi isolado do óleo de *C. langsdorffii* (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Em estudo realizado com diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados, sendo utilizado como biomarcador de óleos de copaíba, segundo Veiga Junior e Pinto (2002) e Rigamonte-Acevedo (2004). No entanto, Gramosa e Silveira (2005) relataram a composição química de várias partes da espécie *Copaifera langsdorffii* coletada na região nordeste, no município de Crato, CE, e não identificaram este diterpeno.

Em trabalho recente Vasconcelos e Godinho (2002) mostraram que o chamado índice de acidez da amostra pode ser usado para detectar adulterações do óleo de copaíba e estabeleceram um valor abaixo de 80 mgKOH/g como indício de que a amostra foi adulterada. Também estabeleceram que, uma vez detectada adulteração, um valor deste índice acima de 23 mgKOH/g indica que o contaminante é óleo graxo e um valor abaixo indica que é material saponificável como etanol ou óleo mineral.

Devido a grande dificuldade em se estabelecer um padrão de qualidade para a comercialização do óleo de copaíba alguns trabalhos vem sendo desenvolvidos na tentativa de se estabelecer normas químicas quantitativas para os produtos farmacêuticos formulados com óleo de copaíba (TAPPIN *et al.*, 2004).

2.2- O Processo cicatricial

A pele (tegumento) é um dos maiores órgãos do corpo e contém várias glândulas, nervos, vasos e músculos. Compõe-se de uma camada de epitélio estratificado plano queratinizado (epiderme) e uma camada de tecido conjuntivo frouxo (derme papilar, mais superficial) e denso (derme reticular, mais profunda) com fibras colágenas, reticulares e elásticas, circundadas por substância matriz mucopolissacarídica. Noventa por cento das fibras dérmicas se compõe de colágeno. Fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos estão presentes por toda derme. Esta também contém a rede de capilares cutâneos, linfáticos, componentes nervosos, músculos eretores dos pêlos, folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (PAVLETIC, 1998).

Em condições normais, o processo cicatricial segue um padrão, podendo ser dividido em três fases específicas: a fase exsudativa ou inflamatória a de fibroplasia ou proliferativa e a de maturação (MODOLIN; BELIVACQUA, 1985; DE NARDI *et al.*, 2004). Apesar das fases de reparação serem descritas de forma seqüencial, na realidade os eventos consistem de interações complexas, superpostas, não existindo um período latente no processo cicatricial (FOSSUM *et al.*, 1997; CANDIDO, 2001).

Na fase exsudativa, predominam eventos relacionados com a coagulação sangüínea, a chamada fase trombocítica e o processo inflamatório. Esta fase é caracterizada pela vasoconstricção seguida de vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma com eritrócitos e movimentação leucocitária. Ocorre agregação plaquetária e ativação dos sistemas de coagulação. As plaquetas são importantes por serem as

primeiras células a produzirem citocinas essenciais à modulação da maioria dos eventos cicatriciais subseqüentes. Além da hemostasia, nessa etapa ainda constatam-se os eventos inflamatórios, predominando a fagocitose pelas células granulocíticas, polimorfonucleares e macrófagos, caracterizando assim as fases granulocítica e macrofágica, respectivamente. Os macrófagos, além da fagocitose também iniciam a reparação pela secreção de proteases, citocinas e substâncias vasoativas que dão continuidade às fases cicatriciais subseqüentes (BOSQUEIRO *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001). Conforme Candido (2001) e Rodrigues *et al.* (2001), esta fase dura de 48 a 72 horas.

A fase proliferativa é caracterizada pelos processos de granulação, contração e epitelização. A granulação é a formação de um tecido composto de capilares, colágeno e proteoglicanos. Nesta fase, a formação capilar resulta da liberação de fatores angiogênicos secretados pelos macrófagos que estimulam a proliferação de células endoteliais dos vasos sanguíneos. Nesta etapa, ocorre a produção de colágeno pelos fibroblastos. Aliada à granulação, manifesta-se a reepitelização com migração e divisão mitótica das células basais nas bordas da ferida (DE NARDI *et al.*, 2004). Este movimento celular é bastante rápido nos ferimentos cirúrgicos, cujas margens das feridas foram adequadamente coaptadas por sutura. Nas feridas abertas a epitelização deve contar com o mecanismo acessório que é a contração (MODOLIN; BELILACQUA, 1985).

O último evento da etapa da cicatrização é a contração, processo pelo qual ocorre o fechamento espontâneo das feridas cutâneas, pela ação especializada dos miofibroblastos (BOSQUEIRO *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001). Esta fase é mais ativa durante 12 dias, segundo Candido (2001) e Rodrigues *et al.* (2001).

A fase de maturação ou de remodelação permanece por meses ou anos (CANDIDO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001) e, nesta, as células inflamatórias agudas e crônicas diminuem gradualmente e cessam a angiogênese e a fibroplasia. É também nesse período que se constata o equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, sendo que esta remodelação é responsável pelo aumento da força tênsil do tecido cicatricial (BOSQUEIRO *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001).

2.3- Retalhos cutâneos

Os retalhos cutâneos são frequentemente utilizados nas cirurgias plásticas reparadoras de perdas de substâncias, resultantes de traumas ou de procedimentos operatórios

e na reconstrução de defeitos e malformações de natureza congênita ou adquirida (FERREIRA, 1995; BICHARD; SMEAK, 1998; PAVLETIC, 1998; SMITH; PRIBAZ, 2000).

Constituem-se de segmentos de pele obtidos de uma área doadora e transferidos para uma região receptora, mantendo uma conexão temporária ou definitiva, através de um pedículo de onde vem o suprimento sanguíneo. Sobrevivem em decorrência de sua circulação intacta, ao contrário dos enxertos livres, que dependem da revascularização do leito receptor. Permitem cobertura imediata do leito de um ferimento e evitam cicatrização prolongada, formação de cicatriz excessiva e contratatura associada com cicatrização por segunda intenção (FOSSUM *et al.*, 2002).

Os retalhos cutâneos na medicina veterinária são classificados de acordo com a irrigação sanguínea, em retalho do plexo subdérmico e retalho do padrão axial. O retalho do plexo subdérmico, também chamado randômico, padrão ao acaso ou retalhos locais são colhidos sem levar em consideração sua vascularização inerente. Este retalho é alimentado pelos ramos terminais das artérias cutâneas diretas, associadas à camada do músculo cutâneo. O retalho de padrão axial incorpora uma artéria e veia cutânea diretas. Possuem excelente irrigação sanguínea e área de sobrevida aproximadamente 50% maior que a dos retalhos de plexo subdérmico com dimensões comparáveis, em cães. Em sua maioria, os retalhos cutâneos utilizados em cães e gatos são elevados sem que sejam incluídas uma artéria e veia cutânea direta (PAVLETIC, 1998; FOWLER, 2004).

Indicam-se retalhos cutâneos quando a cicatrização do ferimento não progride de forma esperada, quando se torna necessária uma pele em espessura completa para impedir os problemas causados por traumatismo repetido, quando o ferimento aberto é tão grande que provocará uma morbidade significativa do paciente e quando for provável que uma contratatura do ferimento cause problema significativo. Podem ser utilizados no revestimento de defeitos com vascularização deficiente, em áreas de difícil imobilização, orifícios suprajacentes a cavidades e em áreas onde sejam essenciais a proteção e a durabilidade (BICHARD; SMEAK, 1998; PAVLETIC, 1998).

A pele elástica e frouxa que reveste a cabeça, pescoço e tronco de cães e gatos permite a sua mobilização para a oclusão de feridas. Em seres humanos comumente há necessidade de enxerto livre para a oclusão do leito doador, depois de extensa transferência de retalho. Os resultados estéticos em cães e gatos dependem das transferências de pele provida de pêlos com coloração e padrão piloso similares aos da área receptora (PAVLETIC, 1998).

Segundo Sakuma, Matera e Valente (2003) as técnicas de flaps ou retalhos cutâneos são versáteis e de fácil execução, apresentam menor custo do manejo da ferida e recobrimento piloso adequado, quando empregados em cães.

Alguns eventos fisiopatológicos podem ocorrer e levar a uma falha na sobrevivência do retalho e podem ser ocasionados por fatores extrínsecos ou intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem algumas condições sistêmicas tais como infecção, arteriosclerose, hipotensão e desnutrição ou causas locais como compressão, tensão, trombos ou dobras no pedículo. Estes fatores contrastam com o único fator intrínseco associado, a insuficiência arterial do retalho (SALMI; HONG; FUTRELL, 1999) que resulta do seccionamento de vasos cutâneos e de terminações nervosas simpáticas provocando a diminuição do fluxo sanguíneo ao longo do retalho (BALDAN, 2005).

Souza Filho *et al.* (2002) mostraram que o tratamento de retalhos cutâneos randomizados em ratos com extrato Ginkgo Biloba (EGB) possibilitou o aumento da taxa de sobrevida destes retalhos.

Almeida *et al.* (2004) observaram por meio das porcentagens das áreas de necrose e do estudo histológico que o dimetil sulfoxido (DMSO) a 5% teve ação benéfica sobre os retalhos cutâneos expressos pela menor área de necrose distal e pelo aspecto histológico de reparação tecidual mais precoce em retalhos randômicos isquêmicos em ratos.

A hialuronidase foi utilizada por Acevedo-Bogado *et al.* (2005) em retalhos cutâneos em ratas, na tentativa de melhorar a sobrevida destes. A hialuronidase degrada o ácido hialurônico presente no tecido conjuntivo que está envolvido na homeostase da água na matriz extracelular. A pesquisa demonstrou com a avaliação da área de necrose dos retalhos, que a melhora da sobrevida produzida pela hialuronidase sugere um mecanismo de redução do componente edematoso. Contudo, não foi possível afirmar que esta favoreça a difusão de nutrientes nos territórios mais distais do pedículo.

Esteves Junior *et al.* (2005) investigaram o efeito da administração do cloridrato de hidralasina, por iontoforese, na viabilidade de retalhos cutâneos, não evidenciando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados.

Baldan (2005) trabalhou com laser vermelho de baixa potência em retalhos cutâneos randômicos em ratos e concluiu que este é capaz de incrementar a viabilidade dos retalhos, quando irradiados com densidade de energia de $20,36\text{J}/\text{cm}^2$.

2.4- Fitoterápicos e princípios de manipulação de pomadas

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2001).

De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário”. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente.

As pomadas são preparações semi-sólidas que geralmente contêm fármacos usados para tratar processos dermatológicos. A quantidade do princípio ativo adicionado ao veículo irá determinar as propriedades terapêuticas do fármaco. A formulação do veículo ideal deverá ter como características ser quimicamente estável, ser homogêneo, ser bacteriostático, ser bem aceito do ponto de vista cosmético, ser farmacologicamente inerte, entretanto não deve ser tóxico, irritativo nem sensibilizante. O veículo “ideal” deve ainda assegurar a estabilidade química do fármaco, uma liberação eficaz e uma penetração eficiente (BORDALO, 2004).

Os emolientes são materiais gordurosos suaves e quando usados de forma tópica hidratam a pele diminuindo a perda hídrica transepidérmica, aumentando a hidratação do estrato córneo. Fazem parte deste grupo os óleos vegetais, gorduras animais e hidrocarbonetos (vaselina). Os demulcentes atuam aliviando a irritação. Podem recobrir a superfície da pele lesada e proteger o estrato córneo e a estrutura celular subjacente da epiderme, formando uma barreira protetora contra o ambiente circundante. A glicerina faz parte deste grupo e quando utilizada em baixas concentrações é absorvida e hidrata o estrato córneo devido a sua ação higroscópica (RIVIERE; SPOO, 2003).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Estudar os aspectos morfológicos e morfométricos de retalhos cutâneos dorsais randômicos em ratos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*).

3.2- Objetivos específicos

A – Avaliar macroscopicamente e clinicamente os retalhos cutâneos dorsais de ratos tratados com óleo de copaíba, até o oitavo dia de pós-operatório;

B – Avaliar morfológicamente o processo inflamatório, regenerativo e cicatricial no oitavo dia de pós-operatório em ratos submetidos ao retalho cutâneo dorsal e tratados com óleo de copaíba;

C – Avaliar morfometricamente os retalhos cutâneos dorsais no oitavo dia de pós-operatório, pela contagem de vasos sanguíneos, leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais e Local

Foram utilizados 30 ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, pesando entre 410 e 430 g, com três meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE. Estes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 10 animais cada e mantidos em caixas individuais em ambiente com temperatura de 23 a 25°C e ciclo claro/escuro controlados de 12 em 12 horas. Receberam ração comercial (Labina® – Purina) e água à vontade.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal do DMFA da UFRPE. Após a ortonásia, os animais foram preparados, congelados, e descartados segundo as exigências dos princípios éticos para trabalhos experimentais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – São Paulo, Brasil, 1991.

4.2- Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram denominados de Grupo Controle Absoluto (GCA) em que um retalho cutâneo dorsal de base cranial foi confeccionado, elevado e recolocado no seu leito; Grupo Controle (GC) em que um retalho cutâneo dorsal de base cranial foi confeccionado, elevado, recolocado no seu leito e recebeu tratamento tópico com pomada contendo apenas o veículo do medicamento (vaselina e glicerina), imediatamente após a cirurgia e diariamente por mais sete dias e Grupo Tratado (GT) em que um retalho cutâneo dorsal de base cranial foi confeccionado, elevado, recolocado no seu leito e recebeu tratamento tópico com pomada contendo óleo de copaíba na concentração de 10% usando vaselina e glicerina como veículo, imediatamente após a cirurgia e diariamente por mais sete dias.

4.3 - Aquisição do óleo

O óleo de copaíba foi adquirido na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais. A coleta do óleo de árvores da espécie *Copaifera langsdorffii* foi realizada no mês de agosto de 2006 a

partir de uma planta registrada sob o número HM00217 do Herbário Mandevilla da Faculdade de Ciências Agrárias do Centro Universitário de Patos de Minas.

O óleo foi coletado na época de estiagem, com auxílio de um trado introduzido no caule da planta e aprofundado da casca para o lenho, sendo armazenado em frascos âmbar para serem utilizados no experimento.

4.4- Análise química do óleo de copaíba

O óleo de copaíba obtido foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas utilizando um cromatógrafo HP 5890B SERIES II, acoplado a um espectrômetro de massas HP-5971, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB5 (30 m x 0.25 mm x 0,25 µm).

A análise cromatográfica (CG) foi obtida utilizando um aparelho Hewlett Packard 5890 SERIES II equipado com um detector de ionização de chama (FID) e com uma coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25µm). As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 220°C e 285°C. Usou-se o hélio como gás de arraste, a uma vazão de 1 mL/min; o programa de temperatura da coluna foi 40°C (1 minuto) até 220°C a 4°C/min; 220°C até 280°C a 20°C/min. Os espectros de massas foram obtidos com um impacto eletrônico de 70eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550. O hidrogênio foi usado como gás de arraste, com velocidade de fluxo 1,5 mL/ min, modo split (1:10). Uma solução de 1,5µL com 10mg de óleo em acetato de etila foi injetada. Os índices de retenção foram obtidos pela co-injeção do óleo com uma mistura de hidrocarbonetos lineares C₁₁-C₂₄ e calculados de acordo com a equação de Doll e Kratz (1963). Os compostos foram identificados com base na comparação dos índices de retenção calculados com os disponíveis na literatura seguida pela comparação do fragmentograma de padrões dos massas reportados na literatura bem como pela comparação direta das sugestões dos massas disponíveis na biblioteca do computador (Wiley, com 250.000 compostos), contemplando apenas as similaridades entre os fragmentogramas (ADAMS, 1995).

A análise química foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5- Análise microbiológica

Logo após a manipulação foi coletada uma amostra de cada pomada para análise microbiológica, utilizando swab estéril. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da UFRPE.

4.6- Preparo das formulações

Foram preparadas duas formulações, a pomada teste e controle, a base de glicerina e vaselina. A formulação teste foi obtida pela adição de óleo de copaíba a 10% ao veículo. A formulação controle, formulada apenas com glicerina e vaselina. As pomadas foram manipuladas no Laboratório de Fitoterapia do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Após a manipulação foram coletadas amostras para exame microbiológico.

Formulação da pomada controle:

Vaselina sólida: 180 g

Glicerina líquida: 10 g

Formulação da pomada teste:

Vaselina sólida: 180 g

Glicerina líquida: 10 g

Óleo de copaíba: 10 g

4.7- Cirurgia para execução do retalho cutâneo dorsal

A confecção de retalho cutâneo randômico de base cranial, com 08 (oito) cm de comprimento e 03 (três) cm de largura foi realizada conforme Acevedo-Bogado (2005) modificado. A área foi demarcada com caneta cirúrgica após tricotomia e antissepsia com clorexidine tópico. Os animais foram anestesiados com anestesia dissociativa com xilazina (Rompum® – Bayer) na dose de 3mg/kg e ketamina (Vetanarcol® – König), 10mg/kg, por via intramuscular, segundo Andrade (2002). Posteriormente foram posicionados em decúbito ventral, com imobilização dos membros com fita adesiva. O retalho cutâneo pré-estabelecido

foi confeccionado pela incisão com bisturi de lâmina número 15 na área demarcada. O retalho foi dissecado e deslocado do plano músculo-aponeurótico adjacente, com tesoura romba, elevado do leito, recolocado e suturado ao mesmo, com sutura simples interrompida utilizando fio monofilamentoso de náilon 4.0 agulhado, mantendo-se conectado por seu pedículo. O retalho era constituído por fáscia superficial, panículo carnoso, tecido subcutâneo e pele. As cirurgias foram realizadas na Área de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

4.8- Tratamento pós-operatório do retalho cutâneo dorsal

Imediatamente após a execução do retalho cutâneo dorsal os ratos do GT foram submetidos a tratamento tópico com o óleo de copaíba em pomada a 10 %. Este procedimento foi repetido a cada 24 horas, completando o total de sete curativos, durante os quais todos os animais eram avaliados clinicamente. Os ratos do GC foram tratados topicamente com pomada contendo apenas o veículo (vaselina e glicerina) durante o mesmo período de tempo. Os animais do GCA não receberam tratamento.

Decorridos oito dias da indução da lesão, foi realizada a coleta de material para análise.

4.9- Coleta e processamento do material

Após oito dias de tratamento os animais foram anestesiados com anestésico inalatório (Isoflurano) e fotografados com câmera digital (Sony W70) a uma distância focal de 20 cm). Após serem coletados fragmentos para o estudo histopatológico os animais foram ortonasiados por aprofundamento do plano anestésico.

Análise Macroscópica: Foram mensuradas as áreas de sobrevida e de necrose do retalho. As áreas de necrose, foram obtidas com a utilização do programa ImagiLab® 2000 como descreve Almeida *et al.* (2004). As feridas foram fotografadas com equipamento fotográfico digital, utilizando um tripé que manteve sempre a mesma distância focal entre a lente e o objeto a fotografar. As fotos foram digitalizadas com resolução de 640 pontos na horizontal e 480 pontos na vertical, 24 bits de cores, com demarcação da área de necrose e área total e posterior cálculo da porcentagem da área de necrose.

Análise Microscópica: Foram coletados três fragmentos do retalho cutâneo dorsal de áreas distintas. Área cranial, contendo tecido sadio, área média, com tecido de transição, situada entre as áreas cranial e caudal, e área caudal, contendo área de necrose. Os fragmentos foram fixados em líquido de Bouïn, por 6 horas e transferidos para o álcool a 70%. Em seguida foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e impregnados e incluídos em parafina líquida (58 °C). Após a inclusão os fragmentos foram cortados em micrótomo rotativo, ajustado para cinco micrômetros (5 µm). Os cortes obtidos foram dispostos em lâminas de vidro, previamente untadas com albumina de Meyer, e corados pela hematoxilina e eosina, e pelo tricrômio de Gomori e posteriormente cobertos com lamínula contendo Entellan®.

O material foi analisado e fotografado em fotomicroscópio de luz Olympus BX-51. A morfometria foi realizada utilizando imagens obtidas em um microscópio Olympus BX-40, com objetiva de 40x para contagem de células e objetiva de 20x para contagem de vasos, acoplado a uma câmara filmadora e esta a um microcomputador com placa de captura de imagem. As imagens obtidas foram analisadas pelo sistema Imagelab 2000® – Sistema de processamento e análise de imagem. Por este método foram quantificados vasos sanguíneos, fibras colágenas, leucócitos e fibroblastos. O preparo de lâminas histológicas, bem como as análises das imagens foram feitos na área de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE.

4.10- Delineamento e Análise Estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) composto por três recursos farmacológicos – Sem tratamento (GCA), pomada apenas com veículo (GC) e pomada contendo óleo de copaíba a 10% (GT). Foram utilizadas 10 repetições para cada recurso farmacológico, sendo considerado cada animal uma unidade experimental.

Os dados obtidos no oitavo dia de pós-operatório para as variáveis da área de necrose, vasos sanguíneos, leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas foram submetidas à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% ($p < 0,05$), conforme Banzatto e Kronka (2006). As análises foram feitas no software SISVAR (FERREIRA, 2000).

5- RESULTADOS

Durante os oito dias de pós-operatório, não foi observado clinicamente, infecção ou hematoma que pudesse comprometer o resultado final da pesquisa. Após 24 horas, os retalhos apresentaram uma coloração arroxeadada em sua porção caudal, porém sem uma demarcação clara entre a área viável e a não viável. Após 03 (três) dias de tratamento, os retalhos cutâneos já mostravam uma delimitação mais evidente do nível da necrose. No oitavo dia o grau de necrose já estava totalmente definido, com delimitação clara entre a área viável e a não viável (Figs. 2,3 e 4). Macroscopicamente o GT apresentou menor porcentagem de área de necrose do que GC e CGA e, à palpação, uma consistência menos endurecida da área necrótica com coloração mais amarelada da área delimitada (Fig. 4). Ao coletar as amostras para exames histológicos, os tecidos com necrose superficial do GT apresentavam-se mais irrigados no lado dérmico e a parte mais superficial (lado epidérmico) menos endurecida quando comparados aos outros grupos, dados também confirmados pelo exame histológico (Tab. 2, Fig 6, 9, 12). Os animais do GT apresentaram áreas de necrose que variavam de 7 a 30%, já os do GC apresentaram áreas de necrose que variavam de 17 a 48% e o GCA, de 33 a 50%.



Figura 2–Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo Controle Absoluto (GCA) no oitavo dia de PO. Observar aspecto escuro da área necrosada (setas).



Figura 3–Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo Controle (GC) no oitavo dia de PO. Observar aspecto escuro da área necrosada (setas).



Figura 4– Fotografia do retalho cutâneo dorsal de animal do Grupo tratado (GT) no oitavo dia de PO. Observar aspecto amarelado da área necrótica (setas).

As análises de variância mostraram-se significantes ($p < 0,05$) para área de necrose (GCA > GC e GT), número de vasos sanguíneos nas partes média e caudal (GT > GCA e GC), número de leucócitos nas partes cranial (GT > GC e GCA), média (GT e GC > GCA) e caudal (GT > GC > GCA), número de fibroblastos nas partes média (GT e GC > GCA) e caudal (GT > GC e GCA) (Tab. 2, 3 e 4). Não houve diferença significativa entre os grupos na contagem de vasos sanguíneos e fibroblastos na parte cranial e para fibras colágenas em todas as partes ($p > 0,05$) (Tabs. 1, 2 e 4)

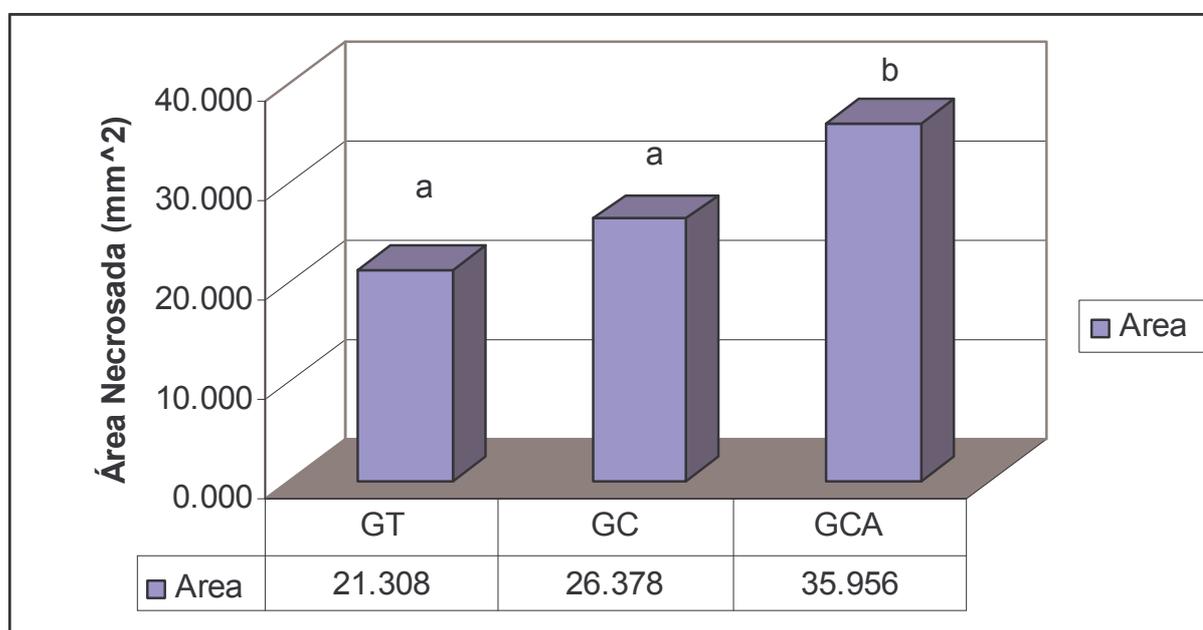


Figura 5- Gráfico demonstrativo do Teste de Tukey para médias das áreas necrosadas. (médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%)

Tabela 1- Média de fibras colágenas do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados.

Grupo	Porção cranial	Porção média	Porção caudal
GCA	92,91 ^{cA}	93,12 ^{cA}	91,54 ^{cA}
GC	91,35 ^{bA}	93,58 ^{bA}	91,89 ^{bA}
GT	94,48 ^{aA}	93,51 ^{aA}	91,65 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na linha e por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O grupo GT apresentou maiores médias de número de vasos sanguíneos nas partes média e caudal do retalho, porém, não houve diferença entre as médias na região proximal do retalho (Tab. 2).

Tabela 2– Média de vasos sanguíneos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados

Grupo	Porção cranial	Porção média	Porção caudal
GCA	5,2 ^{aA}	4,7 ^{bA}	3,0 ^{bB}
GC	5,1 ^{aA}	4,1 ^{bA}	2,5 ^{bB}
GT	5,8 ^{aA}	8,3 ^{aB}	7,1 ^{aAB}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e por letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3– Média de leucócitos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados

Grupo	Porção cranial	Porção média	Porção caudal
GCA	3,9 ^{bA}	3,50 ^{bA}	2,50 ^{bA}
GC	3,8 ^{bA}	4,70 ^{abA}	4,75 ^{aA}
GT	5,7 ^{aA}	6,20 ^{aA}	6,26 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e por letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4– Média de fibroblastos do retalho cutâneo dorsal de ratos Wistar albinos machos nos grupos estudados

Grupo	Porção cranial	Porção média	Porção caudal
GCA	3,90 ^{aA}	3,00 ^{bA}	2,20 ^{bB}
GC	4,14 ^{aA}	3,70 ^{abA}	2,0 ^{bB}
GT	4,22 ^{aA}	4,60 ^{aA}	4,20 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e por letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Ao exame microscópico, a parte cranial do retalho cutâneo nos animais dos grupos GCA, GC e GT apresentou epitélio íntegro com anexos da pele conservados, estroma conjuntivo com pouco infiltrado inflamatório, presença de fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 12, 13, 14 e 15). Na área média do retalho cutâneo, observaram-se focos de tecido necrótico e grande infiltrado inflamatório em todos os grupos, porém com uma intensa proliferação de vasos neoformados no GT (Tab. 2, Fig. 9, 10 e 11) e aumento do número de fibroblastos (Tab. 4). Na parte caudal do retalho cutâneo dos animais do GT foi evidenciado aumento na quantidade de vasos sanguíneo (Fig. 6). As fibras colágenas apresentaram-se bem preservadas e em maior número na parte cranial do GT. Na parte caudal dos grupos GCA e GC, os achados foram semelhantes, com área de necrose tecidual, desestruturação das fibras colágenas, desestruturação dos anexos da pele e alguns vasos neoformados (Fig. 7 e 8). No GT os achados na porção caudal foram semelhantes as dos GC e GCA, porém com maior frequência de vasos sanguíneos neoformados e infiltrado leucocitário (Fig. 6).

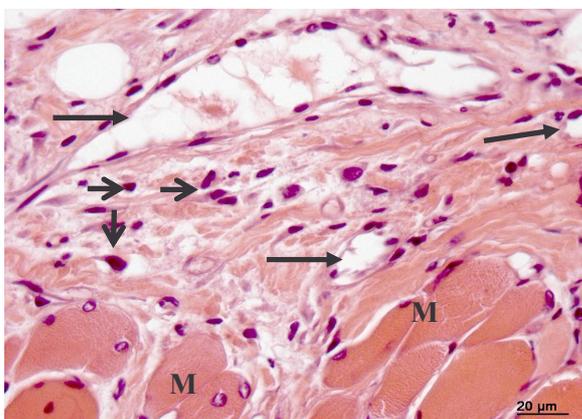


Figura 6– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção caudal. Observar presença de vasos sanguíneos (setas longas), infiltrado leucocitário (setas curtas) e células musculares (M). Coloração H.E. Aum. (barra 20 μm).

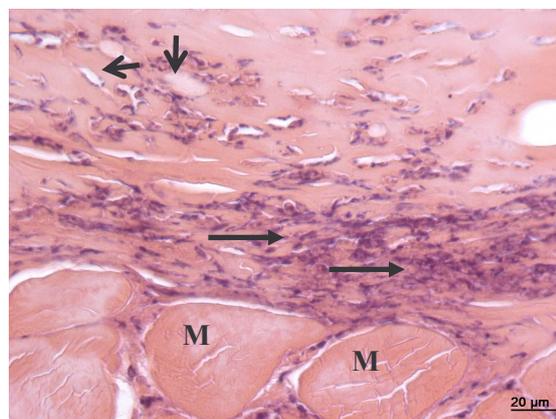


Figura 7– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção caudal. Observar presença de células em processo de necrose (setas longas), células musculares (M) e poucos vasos (setas curtas). Coloração H.E. Aumento (barra 20 μm).

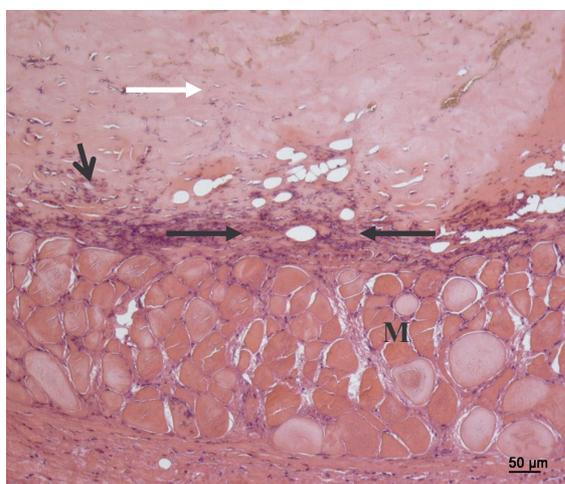


Figura 8 – Fotomicrografia da parte do retalho cutâneo do animal do GCA porção caudal. Observar área necrosada (seta branca), células em processo de necrose (setas longas), células musculares (M) e poucos vasos sanguíneos (seta curta). Coloração H.E. Aumento (barra 50 μm)

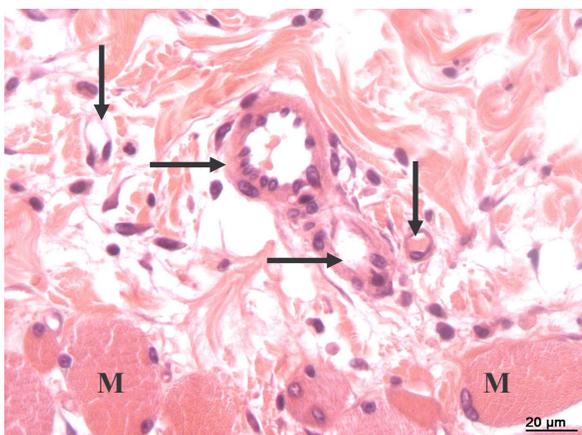


Figura 9– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção média. Observar presença de vasos sanguíneos (setas longas) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 20 μm).

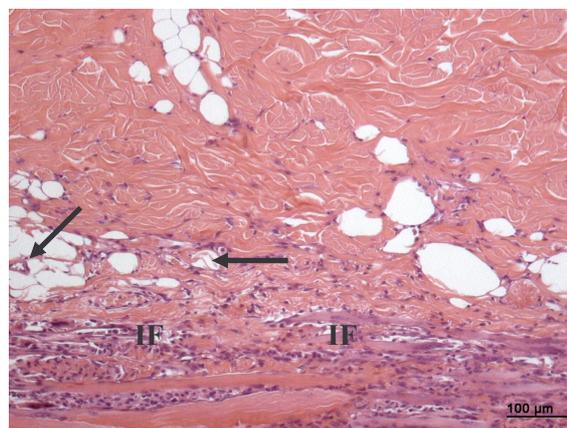


Figura 10– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção média. Observar presença de infiltrado leucocitário (IF) e poucos vasos sanguíneos (setas). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).

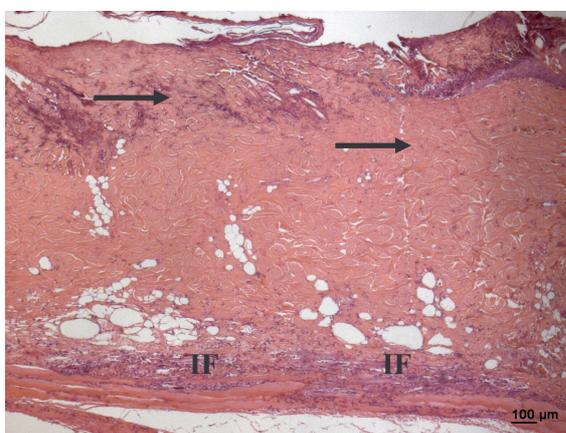


Figura 11- Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GCA porção média. Observar área necrosada (setas longas) e presença de infiltrado leucocitário (IF). Coloração H.E. Aumento (barra 100 μm).

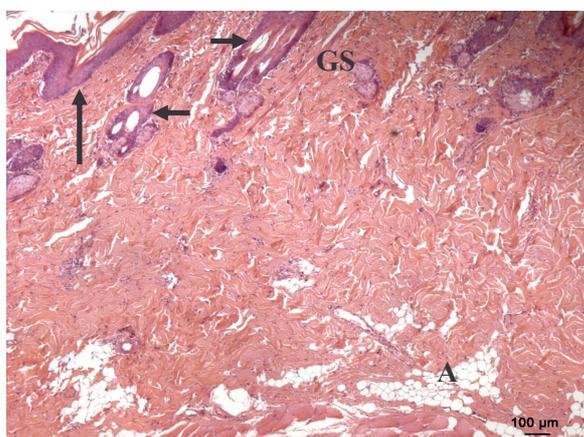


Figura 12– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção cranial. Observar a pele íntegra, com presença da epiderme (seta longa), folículos pilosos (setas curtas), glândulas sebáceas (GS) e células adiposas (A). Coloração H.E. Aumento (barra 100 µm).

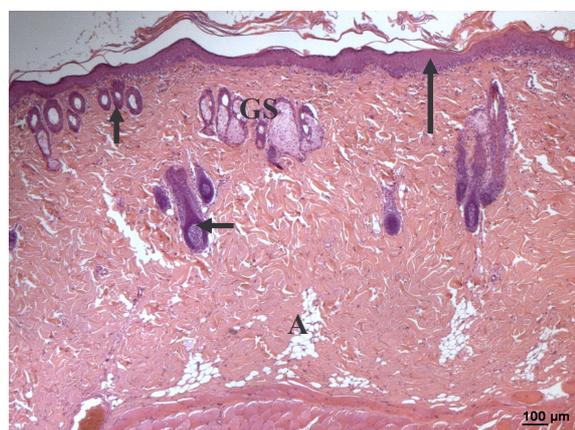


Figura 13– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção cranial. Observar a pele íntegra, com presença da epiderme (seta longa), folículos pilosos (setas curtas), glândulas sebáceas (GS) e células adiposas (A). Coloração H.E. Aumento (barra 100 µm).

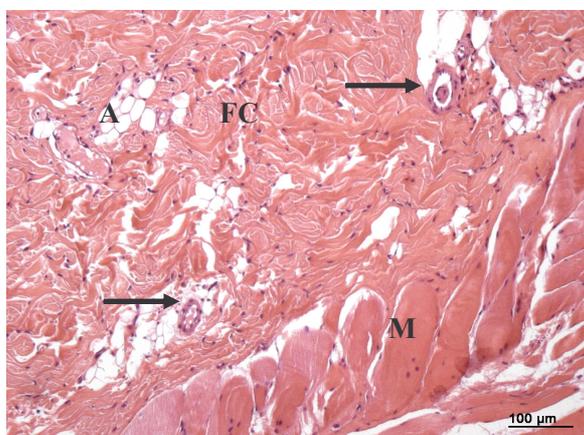


Figura 14– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GT porção cranial. Observar a derme íntegra, vasos sanguíneos (setas), fibras colágenas (FC), células adiposas (A) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 100 µm).



Figura 15– Fotomicrografia de parte de retalho cutâneo de animal do grupo GC porção cranial. Observar a derme íntegra, fibras colágenas (FC), células adiposas (A) e células musculares (M). Coloração H.E. Aumento (barra 50 µm)

As análises microbiológicas das amostras das pomadas imediatamente após a manipulação apresentaram resultado negativo quanto à presença de microorganismos.

A análise por Cromatografia Gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG/EM) do óleo de copaíba forneceu o cromatograma mostrado na Figura 16. A identificação revelou a presença de 16 compostos, constituindo 99,99% do óleo. Destes, 62,82% correspondem aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 10,63% de diterpeno e 26,54% de éster metílico. A Tabela 5 lista todos os constituintes identificados no óleo de copaíba.

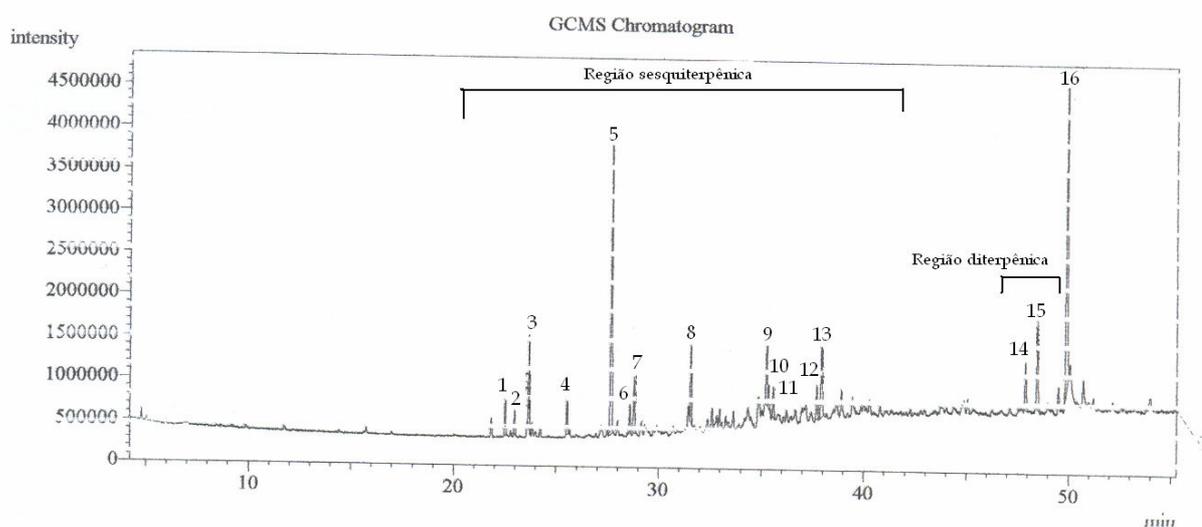


Figura 16 - Cromatograma do óleo de copaíba testado

Tabela 5- Composição química do óleo de copaíba testado no experimento

Composto	Índice de retenção (IR) obtido	% relativa
1 α -cubebeno	1359	2,37
2 Ciclosaviteno	1370	1,51
3 α -Copaeno	1386	5,80
4 β -cariofileno	1429	2,45
5 γ -muuroleno	1480	22,73
6 γ -Patchouleno	1501	1,59
7 Trans- β -guaieno	1506	4,32
8 α -epóxido de cedreno	1575	4,95
9 Zizanona	1670	4,41
10 (Z)- α -santalol	1673	1,39
11 Mustakona	1678	2,08
12 curcumenol	1734	2,45
13 eremofilona	1741	6,77
14 Abieta-8,12-dieno	2028	3,79
15 Caureno	2046	6,84
16 9-octadecenoato de metila	2091	26,54
<i>Sesquiterpenos</i>		62,82
<i>Diterpeno</i>		10,63
<i>Derivado de ácido carboxílico</i>		26,54
Total		99,99

6- DISCUSSÃO

Neste estudo adotou-se o rato como modelo de experimentação devido à facilidade na obtenção, manuseio, acomodação, resistência a manipulação, agressões cirúrgicas e a processos infecciosos, bem como o fato deste animal ser um modelo experimental aceito internacionalmente. Não foram observados processos de irritação local, alergias ou possíveis inflamações que fossem devido ao veículo utilizado na formulação.

O retalho cutâneo efetuado foi do tipo randômico ou ao acaso. Embora muitos estudos tenham sido conduzidos utilizando-se retalhos com irrigação intrínseca que permita a elevação de grandes partes com pouca probabilidade de necrose outros têm se direcionado para as mudanças ocorrentes na microcirculação do retalho cutâneo e para os métodos que impeçam a necrose, quando já se tornou evidente o comprometimento da circulação para a pele (PAVLETIC, 1998).

A determinação do tamanho da área dos retalhos cutâneos randômicos freqüentemente é difícil por apresentarem uma nutrição ao acaso facilitando a uma maior possibilidade de isquemia e necrose. A relação entre a largura do pedículo e o comprimento do retalho cutâneo é fundamental no estabelecimento da sua viabilidade. A isquemia e conseqüente necrose dependerão do aporte sanguíneo permitido pelos vasos do pedículo. Somente a partir do terceiro dia de pós-operatório começam a ser identificados sinais de neovascularização no retalho cutâneo, desde o leito até área cutânea vizinha, sendo que o pedículo secundário estará completo ao redor do nono dia (FERREIRA, 1995; CHEN; PERIM; MARACAJÁ, 1982; ALMEIDA *et al.*, 2004). Segundo Pavletic (1998) a revascularização em ratos, a partir do leito da ferida, tem maior importância que a originária das bordas das feridas, além de ser imprescindível para manter o retalho cutâneo durante 6 a 7 dias.

O período de observação dos retalhos foi estabelecido até o oitavo dia de pós-operatório. Nesta ocasião já se encontra definida a eventual área de necrose e instalados o processo de angiogênese e formação de neovascularização a partir do leito e da área perimetral do retalho, segundo afirmações de Ferreira (1995) e Pavletic (1998).

Um retalho cutâneo dorsal randômico de base cranial de dimensões de 08 cm de comprimento por 03 cm de largura (proporção 2,6:1) foi realizado para se estudar a necrose, revascularização e alterações histológicas. De acordo com Ferreira (1995), os retalhos

cutâneos a princípio apresentavam uma relação comprimento x largura de 1:1, para uma maior segurança. Com outros estudos, esta relação foi modificando de acordo com a irrigação da área operada. O tipo de retalho cutâneo estudado nesta pesquisa teve relação comprimento-largura suficientemente aumentado para poder avaliar os efeitos de um retorno venoso dificultado.

Várias pesquisas foram feitas em ratos utilizando-se dimensões diversas com o objetivo de se estudar a área de necrose de retalhos cutâneos. A proporção comprimento/largura dos retalhos varia de 2,5:1 a 5:1. Pesquisando nesta linha, Almeida *et al.* (2004) confeccionaram um retalho de 08 cm de comprimento por 02 cm de largura e observaram que a área necrosada foi de 47,99% nos animais do grupo controle. Nesta mesma linha Acevedo-Bogado *et al.* (2006), elevaram um retalho cutâneo dorsal de 07 cm de comprimento por 02 cm de largura e observaram que a área necrótica foi de 45,90% no grupo controle. Em nossa pesquisa, observamos média de área de necrose de 37,33% no grupo controle absoluto (que não recebeu nenhum tratamento), utilizando retalho cutâneo dorsal de 8 cm de comprimento por 03 cm de largura. Observou-se que o aumento na proporção do retalho cutâneo foi benéfico na sua viabilidade se comparados aos da pesquisa de Acevedo-Boagado *et al.* (2006) e Almeida *et al.* (2004).

Brito (1996) relatou que o óleo de copaíba (*C. multijuga*) em feridas cutâneas ocasionou diminuição da quantidade de fibras colágenas contradizendo os achados histológicos observados nos animais tratados com o óleo de copaíba (*C. langsdorffii*) neste experimento (Tab. 1). Porém, esse mesmo autor, observou que a partir do 7º dia de pós-operatório a rede vascular apresentava-se mais pronunciada, nos animais tratados com óleo de copaíba, o que está de acordo com os nossos achados (Tab. 2). Eurides *et al.* (1998) observaram aumento do tecido de granulação e vasos sanguíneos durante o processo de reparação tecidual de feridas em cicatrização em ratos, demonstrando ser o óleo de copaíba capaz de aumentar a vascularização. Os nossos resultados, que foram semelhantes a esses relatados por Eurides *et al.* (1998), reforçam a idéia desta ação do óleo de copaíba.

O aumento no número de fibroblastos e vasos sanguíneos nos animais do GT neste experimento está de acordo com a fase proliferativa da reparação tecidual. Nesta segunda fase do processo cicatricial são caracterizados os processos de granulação, com formação capilar e produção de colágeno pelos fibroblastos (MODOLIN; BELILACQUA, 1985). A presença de grande número de leucócitos na porção média e caudal dos animais do GT também é justificável pela presença de células em processo de necrose, agindo estes na fagocitose das

mesmas. Observou-se que o óleo de copaíba foi eficaz no processo cicatricial dos retalhos cutâneos, mantendo-os mais viáveis durante o tempo de reparação tecidual.

Para a formulação do fitoterápico em pomada foi utilizado um emoliente (vaselina sólida) e um demulcente (glicerina líquida). As pomadas utilizadas hidrataram a pele apesar de não evitar que as áreas de necrose se evidenciassem. Segundo Nichter *et al.* (1984) curativos tópicos utilizando antibióticos, melhoram a sobrevida de retalhos cutâneos de ratos, ao diminuir a profundidade da perda dos tecidos em decorrência da dessecação das partes isquêmicas mais profundas do retalho, até que possa ocorrer a revascularização. O veículo (vaselina e glicerina) utilizado na pesquisa (GT e GC) foi eficaz na sobrevida do retalho cutâneo, comprovado quando comparamos os resultados destes grupos (GT e GC) com os do grupo que não recebeu nenhum tratamento (GCA) (Figs 2, 3 e 4). Este resultado deve-se, provavelmente, a ação hidratante da glicerina e vaselina.

Em relação a utilização “*in natura*”, as vantagens da pomada incluem facilidade de aplicação do medicamento sem causar oleosidade excessiva, e diminuição da concentração do fitoterápico ou fármaco utilizado.

O óleo utilizado na pesquisa foi extraído com auxílio de um trado introduzido no caule a uma altura de 1,50m do solo e aprofundado aproximadamente 20 cm da casca para o lenho. Esta técnica também foi utilizada por Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006) que relatam ser a prática de coleta menos agressiva.

O óleo foi coletado na época de estiagem o que favoreceu sua extração. Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006) identificaram como sendo os meses de menor precipitação volumétrica a época mais adequada para extração de diversos óleos de copaíba no município de Moju, PA. Embora estudos realizados com *C. multijuga* por Alencar (1988) demonstraram serem mais abundantes as coletas realizadas na estação chuvosa em árvores localizadas em terreno argiloso.

A análise química realizada com o óleo de copaíba utilizado neste experimento apresentou um perfil químico semelhante aos óleos de copaíba pesquisados por Veiga Junior e Pinto (2002). Tappin *et al.* (2004) trabalharam com diversos óleos de copaíba de árvores nativas do Amazonas e identificaram em óleos provenientes do Baixo Amazonas, uma predominância de sesquiterpenos, acrescidos de teor reduzido de diterpenos, como identificado no óleo testado (Fig. 16, Tab.5). O diterpeno ácido copálico, encontrado por Veiga Junior, Patitucci e Pinto (1997) em todos os óleos comerciais estudados, não foi identificado por Gramosa e Silveira (2005) em estudo com a espécie *Copaifera langsdorffii*,

não sendo também identificado neste experimento. O óleo apresentou presença do derivado de ácido carboxílico, 9-octadecenoato de metila, provavelmente por envelhecimento do próprio óleo, produto este que não apresenta atividades farmacológicas, atuando apenas como adjuvante (FARMACOPÉIA, 2008).

O cromatograma (Fig. 16, Tab.5) confirma a autenticidade do óleo e sua espécie uma vez que os constituintes químicos identificados no óleo testado e no óleo *C. langsdorffii* coletado no município de Crato, CE (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005) foram semelhantes aos encontrados neste experimento.

Nos óleos de copaíba, poucos constituintes ativos identificados foram testados isoladamente, como o β -bisabolol, que contem ação antiinflamatória e o β -cariofileno com ações bactericida, antitumoral e antiinflamatória (VEIGA JUNIOR. *et al*, 2005). Estudos recentes com o ácido caurenóico, obtido do óleo de copaíba de *Copaifera langsdorffii*, demonstraram para este diterpeno diferentes atividades, como vasorelaxante, relaxante do músculo liso em estudos sobre contrações uterinas induzidas, antiinflamatório, protetor de colite induzida por ácido acético, citotóxico e embriotóxico (VEIGA JUNIOR *et al*, 2005). O mecanismo de ação dos princípios ativos do óleo de copaíba ainda não está totalmente esclarecido. A maioria das propriedades contra bactérias e fungos está relacionada aos produtos do metabolismo secundário, encontrados nos óleos essenciais, como terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade antimicrobiana (ADAM *et al.*, 1998). Os terpenos são os principais responsáveis químicos pela fragrância e pelos usos medicinais e culinários de plantas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Pode-se sugerir que os resultados desta pesquisa foram decorrentes de propriedades químicas de um ou mais componentes do óleo testado, que por ação sinérgica, levaria a um aumento da neoangiogênese.

7- CONCLUSÃO

Baseados em nossos resultados podemos concluir que a pomada contendo óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) na concentração de 10% aumentou a viabilidade do retalho cutâneo pela diminuição da área necrótica e pela maior proliferação de vasos sanguíneos na parte média e caudal do retalho, revelando um processo de reparação tecidual mais adequado. Assim, sua utilização é eficaz na viabilidade de retalhos cutâneos dorsais randômicos em ratos.

8- REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinário**. São Paulo: Roca. 2^a ed. 2002. p. 672-673.

ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevivência de retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.1, p.14-16, 2001. Supplement

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 468p.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 1739-1745, 1998.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 4 interptração de dados fenólicos em relação a elementos climáticos. **Acta Amazônica**, Manaus, v.18, n. 3/4, p. 198-209, 1988.

ALMEIDA, K.G.; FAGUNDES, D. J.; MANNA, M.C.B.; MONTERO, E. F. S. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 6, nov./dez. 2004. Disponível em <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 09 jan. 2008.

ARAÚJO JUNIOR, F. A.; BRAZ, M. N.; ROCHA-NETO, O. G.; COSTA, F. D'A.; BRITO, M. V. H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, p. 1-11, jan/fev. 2005.

ATALAY C.; KOÇKAYA, E. A.; ÇETIN, B.; KISMET, K.; AKAY, M. T. Efficacy of topical nitroglycerin and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of random-pattern skin flaps in rats. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive and Hand Surgery**, Stockholm, v.37, p. 10-13, 2003.

BALDAN, C. **Ação do laser vermelho de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos**. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITTO, A. C. BENATTI NETO, C. J. C. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). **Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia**, Curitiba, v.3, n. 16, p. 39-41, jul, 1999.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BARRETO JUNIOR, A. G.; BISCAIA JUNIOR, E. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; CARVALHAES, S. F.; MACIEL, M. A. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 719-722, 2005.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Antiinflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 22, n.1, p. 101-109, 1988.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Clínica de pequenos animais. In: BIRCHARD, S. J.; SMEAK, D. D. **Enxertos cutâneos selecionados e técnicas reconstrutivas**. São Paulo: Roca, 1998. p. 398-403.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; PAULA, J. B.; WEI KIN CHIN, E.; SANTOS, E. A. A.; STALHSCHMIDT, F. L. Effect of buflomedil on ischemic skin flaps: experimental study in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, p. 1 – 7, 2000. Supplement 3.

Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000700008&Ing=es&nrm=iso> Acesso em: 10 nov. 2007.

BORDALO, O. Dermatites de contatos por excipientes de medicamentos tópicos. **Boletim Informativo GPEDC**, [S.l.], v. 8, p. 7-11, 2004.

BOSQUEIRO, C. M. *et al.* **Manual de tratamento de feridas**. Campinas, UNICAMP, 1999.

BRITO, N. M. B. **Aspectos morfológicos e morfométricos da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de copaíba**. 1996. 56 f. Dissertação (Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental)-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1996.

BRITO, N. M. B.; DIAS, C. S.; PIKANÇO JUNIOR, O. M.; DIAS, F. S.; SILVEIRA, E. L.; CARVALHO, R. A. Effect of pentoxifylline in myocutaneous flaps viability in mice. **Revista de Medicina PUCRS**, Porto Alegre, v. 11, n. 4, p. 338-342, out/dez. 2001.

BRITO, N. M. B.; KULAY JUNIOR, L.; SIMÕES, M. J.; MORA, A. O.; RAMALHO, L. N. Z.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos, morfométricos e imunohistoquímicos pelo PCNA, do colo uterino de ratas ooforectomizadas, após aplicação do óleo de copaíba. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [serial online] São Paulo, v. 15, p. 1 - 7, 2000,. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 12 dez. 2007.

BUEMI M; VACCARO M; STURIALE A; GALEANO MR; SANSOTTA C; CAVALLARI V; FLOCCARI F; D'AMICO D; TORRE V; CALAPAI G; FRISINA N; GUARNIERI F; VERMIGLIO G. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic "flaps". **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v. 82, n.6, p. 411-417, 2002.

CAMPOS, H.; FERREIRA, L. M.; SANTOS, W. L. C.; ARAÚJO, M. C. M. Effects of nicotine in skin flaps in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** [serial online] v. 16, n. 4, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 10 ago. 2007.

CANDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo:SENAC, 2001

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUE, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, p. 388-392, 2006.

CHEM, R. C.; PERIM, E. C.; MARACAJÁ, P. F. Estudo de revascularização de retalhos em ratos. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 22-26, 1982.

DENYER, C. V.; JACKSON, P; LOAKES, D. M.; ELLIS, M. R.; YOUND, D. A. B. Isolation of antihinoviral sesquiterpenes from ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of Natural Products**, Pittisburgh, v.57,n. 5, p. 658-662, 1994.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUZA, R. S.; BAUDI, D. L. K.; CASTRO, J. H. T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitamina A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archieves of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

DOOL, H. V.; KRATZ, P. H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gás-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11; p. 463-471, 1963.

ESTEVES JUNIOR, I.; MASSON, I. B.; FERREIRA, L. M.; LIEBANO, R. E.; BALDAN, C.; GOMES, A. C. Topical administration of hydralazine hydrochloride on the viability of random skin flaps in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 164-166, 2005.

EURIDES, D.; MASSANTI, A.; GONÇALVES, G. F.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; CHAVES, N. S. T.; BOMBONATO, P. P.; CAMPOS, V. A.; OGATA, A. S. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de

feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*).

Veterinária Notícias, Uberlândia, v. 4, n. 1, p. 77-82, 1998.

FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaíba balsam (*Copaifera cearensis*). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.73, n. 3, p. 53-56, 1992.

FERREIRA, L. M. Retalhos cutâneos. In: _____. **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 45-62.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...**São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-25.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM III, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. **Small animal surgery**. Saint Louis: Mosby, 1997. p.1335.

FOWLER, D. Retalhos de pele. In: HARARA, J. **Segredos em cirurgia de pequenos animais**. 1ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 98-101.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the brasilian northeast. **Journal of Essencial Oil Research**, [s. l.], v. 17, p. 130-132, mar/apr. 2005.

HUEMER G. M.; WECHSELBERGGER, G.; OTTO-SCHOELLER, A.; GURUNLUOGLU, R.; PIZA-KATZER, H.; SCHOELLER, T. Improved dorsal random-pattern skin “flap” survival in rats with a topically applied combination of nonivamide and nicoboxil. **Plastic Reconstructive Surgery**, Dallas, v. 111, n. 3, p. 1207-1211, 2003.

INDEX Kewensis. Oxford: Claredon Press, 1996. supplement 20.

KJARTANSSON, J.; LUNDEBERG, T.; SAMUELSON, U. E.; DALSGAARD, J. O. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischemic musculocutaneous flaps. **Acta Physiologica Scandinavian**, Madison, v.134, p. 95-99, 1988^a.

LEITE, A.C.P. **Neoextrativismo e desenvolvimento no Estado do Acre**: o caso do manejo comunitário do óleo de copaíba na Reserva Extrativista Chico Mendes. 2004. 124f
Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LIEBANO, R. E.; FERREIRA, L. M.; SABINO NETO, M. Modelo experimental para estimulação elétrica nervosa transcutânea em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, p. 54-59, edição especial, 2003⁶. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>

LIMA, S. R.; JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, nov. 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n.3, p.1-32, 2002.

MATTOS FILHO, A.; RIZZINI, C. T.; MAUTONE, L.; GUIMARÃES, E. F. **Árvores do Jardim Botânico**. Rio de Janeiro: Lidador, 1993. p.67.

MODOLIN, M.; BELIVACQUA, R. G. Cicatrização das feridas: síntese das aquisições recentes. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 208-213, 1985.

NICHTER, L. S.; SOBIESKI, M. W.; MORGAN, R. F.; RODEHEAVER, G.; EDLICH, R. F. Quantitation of skin-flap survival: A computer-based method. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v. 73, n. 4, p. 684-686, apr. 1984.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época da coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

PAIVA, L. A. F.; ALENCAR CUNHA, K. M; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, S. N. Investigation on the wound healing activity of óleo-reain from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, n. 8, p. 737-739, 2002.

PAIVA, L. A. F. **Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e seu constituinte diterpênico ácido kaurenóico em modelos experimentais de inflamação intestinal**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PAVLETIC, M. M. Enxertos pediculados. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1998. p.366-401.

PINHEIRO, J. T. **Avaliação comparativa das infiltrações apicais através do 131 INA nas obturações de canais radiculares com cimento a base de óleo-resina de copaíba. Estudo in vitro**. 1993. 77f. Tese (Doutorado em Dentística e Endodontia) – Fundação Universidade de Pernambuco, Recife, 1993.

RIGAMONTE- ACEVEDO, O. C. **Copaíba: estrutura populacional, produção e qualidade do óleo-resina em populações nativas do sudoeste da Amazônia**. 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais)-Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

RIVIERE, J. E.; SPOO, J. W. Dermatofarmacologia: fármacos de ação local sobre a pele. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 906-922.

RODRIGUES, F. R. *et al.* Curativos em cirurgia. In: MARQUES, R. G. **Cirurgia: instrumental e fundamentos técnicos**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p. 359-374.

SAKUMA, C. H.; MATERA, J. M.; VALENTE, N. S. Estudo clínico sobre aplicação do retalho cutâneo pediculado em cirurgia oncológica no cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 32-37, 2003. Supplement.

SALMI, A. M.; HONG, C.; FUTRELL, J.W. Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischaemic preconditioning: an experimental study in rats. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v.33, p. 163-167, 1999.

SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**. 6. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. p.65.

SAMPAIO, P.T.B. Copaíba. In: CLAY, W; SAMPAIO, P.T.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: INPA, 2000. p. 207-215.

SECCO, R. S. Produtos naturais: alternativa segura? **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.42, p. 807-810, 1990.

SIMÕES, C. A. C. G. **Formulação de um gel de óleo de copaíba (*C. multijuga*) e avaliação de sua atividade antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus* sp. isoladas da placa dental**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SMITH, J. D.; PRIBAZ, J.J. Flaps. In: ERIKSSON, E. **Plastic surgery. indications, operations and outcomes**. Mosby. [s. n.], 2000. v.1.

SOUZA FILHO, M. V. P.; LEAL, P. R. A.; SBALGHIERO, J. C.; MARQUES, M. J. Efeitos do extrato de ginkgo biloba na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 45-56, mai/ago. 2002.

TABOSA, A. M. F.; UEMA, D; ORLANDI, D. M.; FREITAS, R. R. A.; RODGERIO, T.; YAMAMURA, Y. Efeito da estimulação por eletroacupuntura dos pontos VG-14 (*Dazhui*), VG-2 (*Yaoshu*) e F-13 (*Zhangmen*) na vitalização de retalho de pele do dorso de ratos Wistar. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA WORLD MEDICAL ASSOCIATION OF ACUPUNCTURE.2., 2003, São Paulo. **Anais...**, São Paulo:[s.n.], 2203. p. 148-150.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 236-240, abr, 2004.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais da Amazônia**. Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Brasília, DF.: CNPq/MPEG, 1982. p. 145.

VASCONCELO, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002

VEIGA JUNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle da autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, S. R. M.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brasil. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

www.farmacopeia.org.br/downloads/pdf/6ed/oleato_de_etila.pdf. Acesso em 13 de fevereiro de 2008.