

ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA NÃO ALTERA OS NÍVEIS DE AMINOTRANFERASES E ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS SAUDÁVEIS

Data de submissão: 16/08/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Gustavo Lima Guilherme

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/5184561443685507>

Beatriz Alves Arrais de Moraes

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/7119763588874949>

Fernando Assis Brecho de Freitas

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/4096495716124570>

Isabelle Lopes Silva

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/1968655927107534>

Jéssica Cristine da Silva Garcia

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/2839139411980781>

Luciana Ortega Telles

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT

Sinop – Mato Grosso

<http://lattes.cnpq.br/7128053650009682>

Marcos Correa Dias

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/6197853669797333>

Daniilo Henrique Aguiar

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/6873304665152945>

André Ferreira do Nascimento

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/2409963584311546>

Gisele Facholi Bomfim

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/7128053650009682>

Renata de Azevedo Melo Luvizotto

Universidade Federal de Mato Grosso,
Câmpus, Sinop/MT
Sinop – Mato Grosso
<http://lattes.cnpq.br/7346456186010223>

RESUMO: Com função vital no metabolismo, o fígado é uma víscera que participa de diferentes processos. Sabe-se que o óleo-resina de copaíba exerce efeitos benéficos no tecido hepático de animais com comorbidades, entretanto ainda pouco é estudado em condições normais. Assim, nosso objetivo foi avaliar o efeito do óleo-resina de copaíba sobre os níveis de aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e esteatose hepática em animais saudáveis. Ratos *Wistar* foram casualmente divididos para receberem dieta padrão (C, n=6) ou dieta padrão e suplementação com óleo-resina de copaíba (C+O, n=6), na dose de 200mg/kg/dia, por oito semanas. Ao final do experimento foram aferidos o peso corporal, peso das gorduras, peso do fígado e coletado tecido hepático e sangue para as análises histológicas e bioquímicas, respectivamente. A análise estatística foi realizada por meio dos testes *t* de Student ou Mann-Whitney, com nível de significância de $P < 0,05$. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso (processo # 23108.100444/2021-84). Não houve diferença no consumo calórico e no peso corporal final entre os grupos, entretanto o grupo suplementado com óleo-resina de copaíba apresentou menor gordura visceral e, conseqüentemente, menor índice de adiposidade. Não houve diferença no peso do fígado. Os animais suplementados com óleo-resina de copaíba não apresentaram alteração dos marcadores de lesão hepática, ALT e AST. Além disso, não houve alteração nos achados histológicos para esteatose e inflamação. Concluímos que a suplementação com 200 mg/kg de peso/dia de óleo-resina de copaíba reduz a gordura corporal e não influencia os níveis das aminotransferases hepáticas, AST e ALT, ou a morfologia microscópica do fígado de animais sem comorbidades, sugerindo o uso seguro de desse óleo-resina.

PALAVRAS-CHAVE: óleo-resina de copaíba, aminotransferases, esteatose hepática.

COPAIBA OLEORESIN DOES NOT ALTER AMINOTRANSFERASES LEVELS AND HEPATIC STEATOSIS IN HEALTHY RATS

ABSTRACT: With a vital role in metabolism, the liver is an organ that participates in various processes. It is known that copaiba oleoresin has beneficial effects on the liver tissue of animals with comorbidities; however, it is still understudied on normal rats. We aimed to evaluate copaiba oleoresin effects on aminotransferases levels, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT), as well as hepatic steatosis in healthy animals. *Wistar* rats were randomly divided to receive a standard diet (C, n=6) or a standard diet with copaiba oleoresin supplementation (C+O, n=6) at a dose of 200mg/kg/day for eight weeks. At the end of the experiment, body weight, fat weight, liver weight, hepatic tissue, and blood were collected for histological and biochemical analyses, respectively. Statistical analysis was performed using Student's *t*-tests or Mann-Whitney tests, with a significance level set at $P < 0.05$. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Use at the Federal University of Mato Grosso (process # 23108.100444/2021-84). There was no difference in caloric intake and final body weight between the groups; however, the group supplemented with copaiba oil-resin showed lower visceral fat and consequently, a lower adiposity index. There was no difference in liver weight. Animals supplemented with copaiba oleoresin did not exhibit changes in liver injury markers, ALT and AST. Furthermore, there were no alterations in histological findings related to steatosis and inflammation. We conclude that copaiba oleoresin supplementation, 200 mg/kg/day, reduces body fat and does not affect

hepatic aminotransferases levels or the microscopic liver morphology of animals without comorbidities, suggesting the safe use of this oleoresin.

KEYWORDS: copaíba oleoresin, aminotransferases, hepatic steatosis. Parte superior do formulário

1 | INTRODUÇÃO

O Brasil se sobressai por abrigar cerca de um terço da flora global, abrangendo a região amazônica, onde encontra-se a maior reserva de substâncias naturais com propriedades fitoterápicas (SANTOS et al., 2011). Essa riqueza botânica impulsiona pesquisas voltadas para o avanço de remédios fitoterápicos no âmbito da comunidade científica internacional (FRANÇA et al., 2008).

A *Copaifera* ssp., da família Fabaceae, é uma árvore tropical frequentemente encontrada no Brasil, especialmente na área central e oeste da região amazônica. O óleo-resina extraído do tronco da *Copaifera* ssp. é composto por uma porção de resina não volátil diluída em óleo essencial (VEIGA JR et al., 2007). O óleo essencial é composto por sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, enquanto a parte não volátil da resina é constituída por ácidos diterpênicos (CARVALHO; MILKE, 2014).

O óleo-resina de copaíba tem sido extensivamente empregado como uma forma de medicina tradicional nas regiões neotropicais ao longo de milênios e continua sendo uma abordagem popular para diversas doenças devido às suas diversas atividades biológicas (TRINDADE et al., 2018). Dentre suas propriedades, destacam-se ações antimicrobianas, germicidas, analgésicas e antineoplásicas (BANDEIRA et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2008; VEIGA JR et al., 2007; GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; DE BARI et al., 2016; BANDEIRA et al., 2016). Um dos efeitos mais explorados é o potencial anti-inflamatório resultante da sinergia entre os componentes do óleo-resina (IZUMI et al., 2012).

O fígado, o maior órgão interno do corpo, desempenha múltiplas funções essenciais. Cerca de 80% da massa hepática é constituída pelo parênquima hepático, composto por duas populações de células epiteliais: hepatócitos e colangiócitos. Os hepatócitos realizam o processamento e absorção de nutrientes, a produção de proteínas séricas, fatores de coagulação sanguínea e o metabolismo de substâncias farmacêuticas e toxinas, desempenhando um papel central no metabolismo (GADD et al., 2020).

Foi demonstrado que o óleo-resina de copaíba exerce efeitos benéficos no tecido hepático de animais com comorbididades (TELLES et al., 2020), entretanto ainda pouco é estudado seu efeito em condições normais. Assim, é importante avaliar os efeitos do óleo-resina de copaíba sobre o fígado de animais saudáveis, para verificar e corroborar a segurança do seu uso. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do óleo-resina de copaíba sobre os níveis de aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e esteatose hepática em animais saudáveis.

2 | METODOLOGIA

2.1 Delineamento experimental

Ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 320 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) foram divididos casualmente para receberem dieta padrão (C, n=6) ou dieta padrão e suplementação com óleo-resina de copaíba (C+O, n=6), na dose de 200mg/kg/dia via gavagem, por oito semanas. Animais designados para o grupo não tratado (grupo C) foram submetidos a gavagem com uma substância inerte (veículo) em um volume equivalente ao oferecido ao grupo tratado com o suplemento. Os animais foram mantidos em caixas coletivas, em ambiente com temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas ($55\pm 5\%$) e ciclo claro-escuro (12-12hs). Ao final do experimento foram eutanasiados por decapitação após anestesia com tiopental (50mg/kg) e posteriormente, aferidos peso das gorduras, peso do fígado e coletado tecido hepático e sangue para as análises histológicas e bioquímicas, respectivamente. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso (processo # 23108.100444/2021-84), e seguiu as recomendações de Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei 11.794/2008.

2.2 Avaliação de parâmetros morfológicos e nutricionais

O peso corporal foi verificado semanalmente e o consumo de ração e água mensurado três vezes/semana, para avaliação da ingestão alimentar e calórica. Após o sacrifício foram dissecados o fígado e os depósitos de gordura epididimal, mesentérico e retroperitoneal dos animais. A soma dos depósitos é considerada a gordura visceral. A gordura visceral normalizada pelo peso corporal $[(\text{epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{mesentérico}) / \text{peso corporal} \times 100]$ foi considerada o índice de adiposidade (NASCIMENTO et al., 2011).

2.3 Avaliação bioquímica sérica

Kits enzimático-colorimétricos comerciais foram usados para dosar os níveis de aspartato aminotransferase (AST) (Bioclin, Cat# k048, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e alanina aminotransferase (ALT) (Bioclin, Cat# k049, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil)

2.4 Avaliação histológica

Amostras de fígado embutidas em resina foram cortadas em seções com espessura de 3 micrômetros e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. As seções de fígado foram avaliadas quanto aos escores de inflamação hepática e esteatose, sendo classificadas em uma escala de 0 a 3 (SOUZA et al., 2021).

2.5 Análise estatística

Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão ou mediana (amplitude total). A comparação entre os grupos foi realizada por meio dos testes *t* de Student ou Mann-Whitney, com nível de significância de $P < 0,05$.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm sido empregadas para uma variedade de condições e são consideradas fontes significativas na busca por princípios ativos que desempenham um papel crucial no tratamento de diversas doenças. Devido à sua eficácia, os compostos naturais são reconhecidos como uma alternativa viável aos medicamentos convencionais (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). No entanto, a utilização desses compostos precisa ser avaliada inclusive em circunstâncias normais, especialmente considerando a facilidade de acesso a eles.

Foi encontrado, nesse estudo, que os animais suplementados com óleo-resina de copaíba não apresentaram alteração no peso do fígado, no consumo calórico ou no peso dos animais, contudo apresentaram diminuição da gordura visceral, e, conseqüentemente, índice de adiposidade reduzido (Tabela 1). Nesse sentido e corroborando nossos dados, estudo *in vitro* mostrou um efeito antiobesogênico do β -cariofileno, composto ativo do óleo-resina de copaíba, o qual reduziu o acúmulo intracelular de triglicérides sem interferir no número de adipócitos em cultura celular 3T3-L1 (GEDDO et al., 2019).

Variáveis	Grupos	
	C	OC
Peso corporal inicial (g)	325 \pm 16,6	324 \pm 33,6
Peso corporal final (g)	455 \pm 17,2	427 \pm 37,3
Ingestão calórica (kcal)	101 \pm 1,89	101 \pm 5,01
Gordura visceral (g)	30,1 \pm 3,19	24,6 \pm 5,12*
Índice de adiposidade (%)	6,8 \pm 0,59	5,9 \pm 0,77*
Peso do fígado (g)	11,9 \pm 1,4	12,2 \pm 1,5

C: controle; OC: óleo-resina de copaíba. Dados expressos em média \pm desvio-padrão (n=6). Para comparação entre grupos foi utilizado teste *t* de Student.

Tabela 1. Parâmetros nutricionais e morfológicos

A suplementação com óleo-resina de copaíba não modulou os níveis de ALT e AST (Tabela 2). Nossos dados estão de acordo com estudo conduzido por Gonçalves, 2014, que mostrou que a dose de 200 mg/kg/dia, por 8 semanas consecutivas, não altera os níveis dessas enzimas.

As aminotransferases (ALT e AST) catalisam a transferência reversível de uma amina de um aminoácido para um cetoácido (LEHNINGER, 2000). ALT é uma enzima encontrada

principalmente nos hepatócitos (concentrações mais baixas nos tecidos cardíaco, renal e muscular) e, portanto, é específica para a lesão hepatocelular. Os níveis de ALT geralmente flutuam ao longo do dia. A ALT contribui para a síntese de glutamato e piruvato no hepatócito, desempenhando um papel crucial na produção de energia. Os valores normais de ALT para homens estão na faixa de 29-33 UI/L, enquanto para mulheres estão entre 19-25 UI/L. Similarmente à ALT, a AST é uma enzima presente no fígado, porém também é encontrada em níveis mais significativos em outros locais, como o músculo esquelético, o músculo cardíaco, o tecido renal e o cérebro. Ao avaliar níveis de AST que estejam fora da faixa normal, é importante considerar a presença desta enzima em múltiplos tecidos (KALAS et al., 2021).

Variáveis	Grupos	
	C	OC
AST (mg/dL)	271 ± 57	302 ± 91
ALT (mg/dL)	83,5 ± 26,5	85,8 ± 16,6

C: controle; OC: óleo-resina de copaíba; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Dados expressos em média ± desvio-padrão (n=6). Para comparação entre grupos foi utilizado teste *t* de Student.

Tabela 2. Avaliação das aminotransferases séricas

Estudos que avaliam o acúmulo de gordura no fígado e a inflamação hepática são cruciais para obter informações detalhadas sobre o estado do fígado, identificando alterações patológicas que podem estar relacionadas a diversas condições médicas.

A esteatose hepática, também conhecida como doença hepática gordurosa, resulta da acumulação excessiva (mais de 5% do peso do fígado) de lipídios, principalmente triglicerídeos, em hepatócitos, manifestando-se em formas microvesiculares ou macrovesiculares. Os principais fatores de risco para essa condição incluem distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia, assim como outras comorbidades que causam lesões nos hepatócitos, como hepatite C, uso de medicamentos e consumo de álcool (SILVA et al., 2020).

Da mesma forma que a esteatose, a avaliação histológica também engloba a análise da inflamação hepática, que é a resposta do sistema imunológico a lesões e estresses no fígado. Mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, podem impactar diretamente os hepatócitos, intensificando os processos lipogênicos. Além disso, esses mediadores têm influência tanto nos hepatócitos quanto nas células de Kupffer (macrófagos hepáticos), acelerando a progressão da inflamação no fígado (CAI et al., 2018).

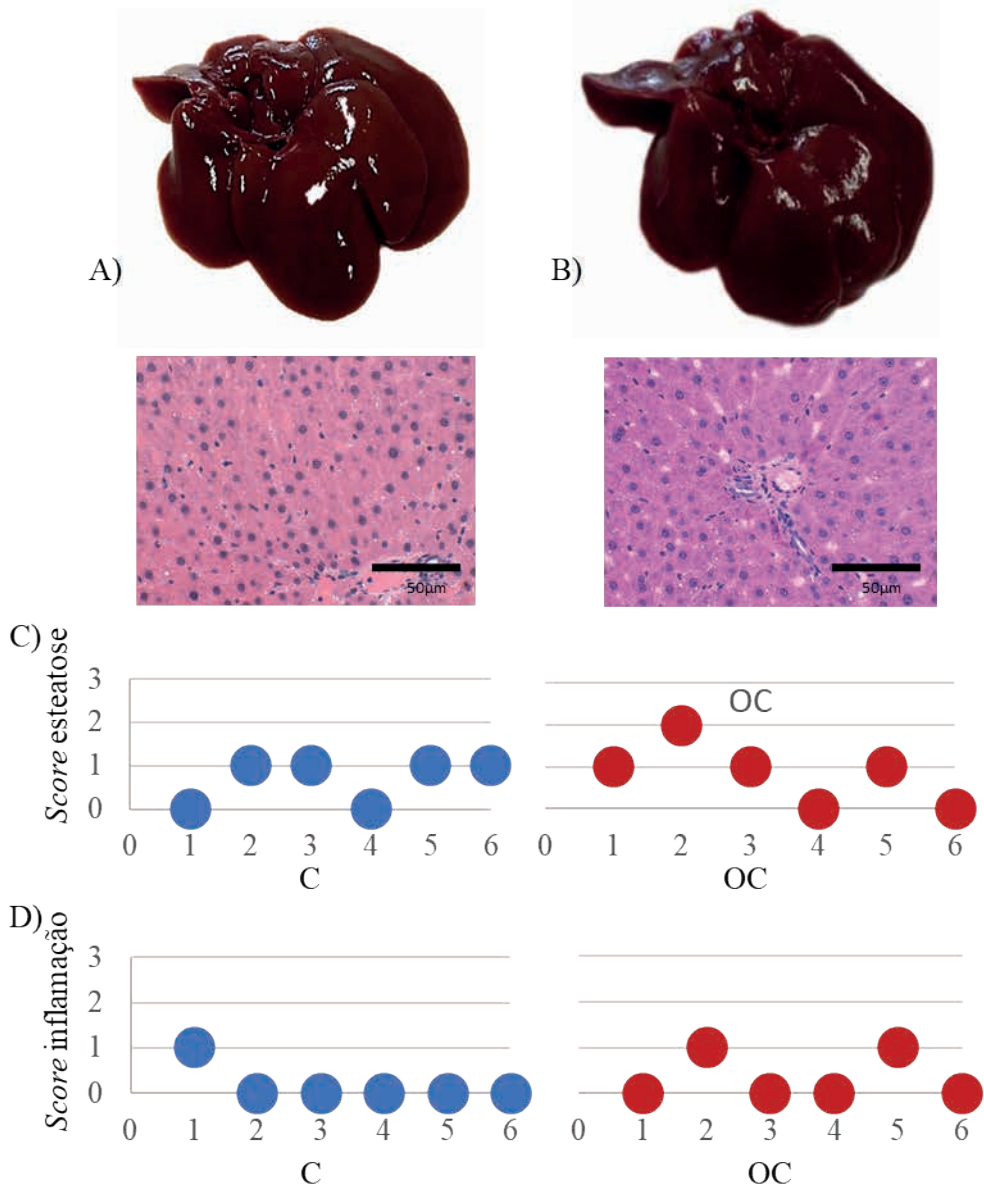


Figura 1. A) Imagem representativa do fígado e seção histológica, corada com Hematoxilina/Eosina, de animais controle (C); B) Imagem representativa do fígado e seção histológica, corada com Hematoxilina/Eosina, de animais que receberam óleo-resina de copaíba (OC); C) Avaliação histológica – distribuição de score de esteatose hepática; D) Avaliação histológica – distribuição de score de inflamação hepática. Para comparação entre grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney.

Nesse estudo, os dados histológicos não mostraram alteração significativa para esteatose [C= 1 (1) e C+O= 1 (2); $P>0,05$] e inflamação [C= 0 (1) e C+O= 0 (1); $P>0,05$] (Figura 1), mostrando ausência de efeitos indesejáveis. Contudo, estudo realizado por

Castro Ghizoni et al. (2017) mostrou que animais controle tratados com 1.15 g·kg⁻¹ do óleo-resina de copaíba apresentaram alterações histológicas, como dilatação sinusoidal, distorção da arquitetura normal dos hepatócitos, perda de organização em cordões e maior presença de células de Kupffer. Vale ressaltar que a dose (1.15 g·kg⁻¹) foi maior do a utilizada nesse estudo, demonstrando que doses elevadas podem estar associadas a efeitos hepáticos adversos.

4 | CONCLUSÃO

A suplementação com óleo-resina de copaíba não altera os níveis das aminotransferases hepáticas, AST e ALT, ou a morfologia microscópica, não apresentando efeitos indesejáveis sobre fígado de animais saudáveis, demonstrando, assim, segurança no seu uso.

AGRADECIMENTO

Somos gratos à Bianca S. Silva e Angélica M. B. Paulino pelo auxílio na condução do estudo, e à Morena A. Giordani e Cleberson Lira pelo apoio técnico. Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso (processo # 571424/2014) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, M. F. C. L. *et al.* **Dentin cleaning ability of an amazon bioactive: evaluation by scanning electron microscopy.** *Open Dent J*, v.10, p.182-187, 2016. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010182>.
- BANDEIRA, M. F. C. L. *et al.* **Estudo farmacológico preliminar de Copaifera multijuga (óleo de copaíba).** *J Bras Clin Estet Odont*, v.3, p.39-41, 1999.
- CAI, Y. *et al.* **Disruption of adenosine 2A receptor exacerbates NAFLD through increasing inflammatory responses and SREBP1c activity.** *Hepatology*, v.68, n.1, p.48-61, 2018. doi: 10.1002/hep.29777.
- CARVALHO, L. O.; MILKE, L. T. **Importância terapêutica do óleo-resina de copaíba: enfoque para ação antiinflamatória e cicatrizante.** *Revista eletrônica de Farmácia*, v. 11, n. 2, 2014.
- CASTRO GHIZONI, C. V. *et al.* **Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats.** *J Cell Biochem*, v.118, n.10, p.3409-3423, 2017. doi: 10.1002/jcb.25998.
- DE BARI, C. C. *et al.* **Avaliação da atividade antibacteriana de um biomodificador dentinário à base de óleo de Copaifera multijuga Hayne.** *Rev Bras Farmacogn*, v.26, p.497-501, 2016.
- FRANÇA, I. S. X. *et al.* **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais.** *Rev Bras Enferm*, v.61, p.201-208, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009>.

GADD, V. L. *et al.* **Epithelial Plasticity during Liver Injury and Regeneration.** *Cell Stem Cell*, v.27, n.4, p.557-573, 2020. doi: 10.1016/j.stem.2020.08.016.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. **Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica.** *Saúde e Pesquisa*, v.5, p.137-146, 2012.

GEDDO, F. *et al.* **PipeNig[®]-FL, a Fluid Extract of Black Pepper (*Piper Nigrum* L.) with a High Standardized Content of *Trans*- β -Caryophyllene, Reduces Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes and Improves Glucose Uptake in C2C12 Myotubes.** *Nutrients*, v.11, p.2788, 2019.

GONÇALVES, E. D. S. **Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae).** 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/11946>. Acesso em: 04 ago. 2023.

IZUMI, E. *et al.* **Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity.** *J Med Chem*, v.55, p.2994-3001, 2012. <https://doi.org/10.1021/jm201451h>.

KALAS, M. A. *et al.* **Abnormal liver enzymes: A review for clinicians.** *World J Hepatol*, v.13, n.11, p.1688-1698, 2021.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

NASCIMENTO, A. F. *et al.* **Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity.** *Life Sci*, v.88, n.23-24, p.1031-1038, 2011.

SANTOS, R. L. *et al.* **Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde.** *Rev Bras Plantas Med*, v.13, p.486-491, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400014>.

SILVA, L. C. M. *et al.* **Análise da elastografia por ultrassonografia em pacientes com esteatose hepática.** *Radiol Bras*, v.53, n.1, p.47-55, 2020.

SOUZA, S. L. B. *et al.* **Exercise Training Attenuates Cirrhotic Cardiomyopathy.** *J Cardiovasc Trans Res*, v.14, p.674-684, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-09997-0>

TELLES, L. O. *et al.* **Copaiba oleoresin prevents obesity development and its hepatic complications in high-sucrose diet model.** *Curr Topics Phytochem*, v.16, p.55-63, 2020.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K; SETZER, W. N. ***Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology.** *Int J Mol Sci*, v.19, n.5, p.1511, 2018. doi: 10.3390/ijms19051511.

VASCONCELOS, K. R. F. *et al.* **Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga*.** *Rev Bras Farmacogn*, v.18, p.733-738, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500017>.

VEIGA JÚNIOR, V. F. *et al.* **Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study.** J Ethnopharmacol, v.112, p.248-254, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005>.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H. *et al.* **Plant extracts and reactive oxygen species as two counteracting agents with anti-and pro-obesity properties.** Int J Mol Sci, v. 20, n. 18, p. 4556, 2019