

## Atividade Tóxica e Mutagênica do Óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) em Camundongos

Chen-Chen, L. ; Sena, M. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Radiobiologia de Microorganismos e Mutagênese / Depto de Biologia Geral / ICB/ UFG Campus-II 74001-970 Goiânia -GO E-mail : [chenlee@icb1.ufg.br](mailto:chenlee@icb1.ufg.br)

**RESUMO:** O óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) que tem sido utilizado pela população brasileira para tratamento de câncer, úlcera, sífilis, bronquite e diarreia mostrou uma potente atividade antitumoral contra carcinoma IMC em camundongos. No presente trabalho foi avaliada a atividade mutagênica e citotóxica desse óleo, para isso foi utilizado o teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos *Mus musculus*. Grupos de 7 camundongos foram tratados com óleo de copaíba por administração oral com doses de 2,11mL/kg (25% de DL<sub>50</sub>), 4,22mL/kg (50% de DL<sub>50</sub>) e 6,76mL/kg (80% de DL<sub>50</sub>). Para todas as doses utilizadas, a frequência de micronúcleos foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h após administração. A citotoxicidade foi avaliada pela relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC). Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPCMN) para as doses de 4,22mL/kg (50% da DL<sub>50</sub>) e 6,76 mL/kg (80% da DL<sub>50</sub>). Em relação ao tempo de administração, a frequência máxima de micronúcleos (MN) foi observada no tempo de 24 horas. Pelos resultados obtidos pôde-se sugerir que o óleo de *Copaifera langsdorfii* Desfon exibiu a atividade mutagênica. A citotoxicidade foi evidenciada em todas as doses aplicadas.

**Palavras-chave :** testes de mutagenicidade, micronúcleos, camundongos, plantas medicinais

**ABSTRACT: Toxic and mutagenic activity of oleoresin of Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) in mice.** The oleoresin of Copaíba, *Copaifera langsdorfii* Desfon, which has been used by the Brazilian population for treatment of cancer, ulcer, syphilis, bronchitis, and diarrhea, showed a potent anti-tumor activity against IMC carcinoma in mice. In this present study, the aim was to evaluate the mutagenic activity and the cyto-toxicity of the oleoresin of "copaíba" in the mouse, with the bone marrow micronucleus test. Doses of oleoresin of 2.11ml/kg (25% of LD<sub>50</sub>), 4.22mL/kg (50% of LD<sub>50</sub>), and 6.76mL/kg (80% of LD<sub>50</sub>) were given by oral administration to mice *Mus musculus* in groups of 7 animals for each treatment. For all the doses, micronucleated polychromatic erythrocytes frequency (MNPCE) was evaluated at periods of 24, 48, and 72 hours. Cytotoxicity was evaluated polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio (PCE and NCE). Results showed that the oleoresin in doses of 4.22 mL/kg, (50% of LD<sub>50</sub>) and 6.76mL/kg (80% of LD<sub>50</sub>) increased significantly ( $p < 0.001$ ) the frequency of MNPCE compared to negative control group. In relation to the administered time, the maximum frequency of induction of MNPCE was observed in 24h. These results indicate that the oleoresin of "copaíba" exhibited mutagenic activity. Cytotoxicity was evident in all dosages applied.

**Key words:** mutagenicity tests, micronuclei, mice, medicinal plants.

### INTRODUÇÃO

A espécie *Copaifera langsdorfii* Desfon pertence à família Leguminosae. Esta espécie é genuinamente brasileira, encontrada em campos e cerrados nas regiões do Pará, Goiás, Mato Grosso e Amazonas (Peckolt, 1942). É uma árvore frondosa, atingindo altura de até 13 metros. Esta planta possui na região cortical do caule canais secretores dispostos de tal forma que se prolongam até o lenho, formando bolsas compridas que ficam repletas de óleo-resina, designado óleo de copaíba (Pio Correia, 1969). Este óleo é transparente e insolúvel em água, com coloração variável do amarelo pálido ao castanho dourado, apresentando-se algumas vezes incolor, de viscosidade variável, possuindo cheiro forte, sabor amargo e acre persistente. Os compostos terpênicos constituem

a maior e mais diversificada classe de substâncias isoladas do óleo das espécies do gênero *Copaifera*. A classe de diterpenos contribui com maior número de compostos no óleo da espécie, sendo que já foram isolados nesta espécie clerodane e diterpenos de esqueleto labdane, tais como ácido copálico, ácido hardwick e kolavenol. A investigação da atividade biológica demonstrou que kolavenol possui atividade antitumoral em ratos (Ohsaki et al., 1994) bem como atividade tripanocida (Freiburghaus et al., 1998). Dessa maneira, é de grande interesse que se consiga identificar compostos com propriedades farmacológicas e que não apresentem atividade mutagênica. O objetivo do presente trabalho é avaliar a possível atividade mutagênica e tóxica do óleo de copaíba pelo teste de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Este teste permite avaliar a atividade clastogênica e/ou aneugênica de agentes

Recebido para publicação em 24/08/01 e aceito para publicação em 12/06/02.

físicos e químicos pela análise da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de camundongos. A atividade tóxica é avaliada pela relação da frequência de EPC e ENC (Heddle, 1973). Este ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos outros, entre as quais pode-se citar principalmente o baixo custo e a confiabilidade. Trata-se de um teste que utiliza mamíferos que apresentam capacidade de metabolização similar aos seres humanos, a qual dificilmente pode ser reproduzida em integral em ensaios "in vitro" (Rabello-Gay et al., 1991).

## MATERIAL E MÉTODO

### Camundongos

Foram utilizados 77 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) out bred, sem discriminação de sexo, pesando entre 30 e 40 g, com idade de 8 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram trazidos 5 dias antes da realização do experimento para o biotério do instituto, onde foram mantidos à temperatura ambiente que ficava em torno de 30°C. Durante esse período os camundongos foram mantidos em gaiolas de plástico de dimensão de (40x30x16) cm, forradas com serragem de madeira trocada diariamente. Os animais foram alimentados com ração comercial e água. Ambas foram oferecidas "ad libitum".

### Óleo de Copaíba (*Copaiba langsdorfii* Desfon)

O óleo de copaíba foi coletado no bosque do Campus Samambaia da Universidade Federal de Goiás Goiânia - GO. A extração foi feita no mês de agosto no período seco da região.

### Drogas e Reagentes

Ciclofosfamida -  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$  (Genuxal - Asca Médica).

Fosfato de sódio dibásico -  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (Merck).

Fosfato de sódio monobásico -  $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$  (Merck).

Giemsa (Doles)

Metanol -  $CH_4O$  (Ecibra)

Soro bovino fetal (Laborclin).

### Procedimento Experimental

Grupos de 7 camundongos foram tratados com óleo de copaíba por administração oral com doses de 2,11mL/kg, 4,22mL/kg e 6,76mL/kg. Após cada tratamento os animais foram mantidos por período de 24, 48 e 72 horas (h) e então sacrificados. Para controle positivo foi administrado dose oral de 86,55 mg/Kg (15% da  $DL_{50}$ ) de ciclofosfamida (Sena, 1997) e controle negativo  $H_2O$  destilada estéril. Após 24, 48 e 72

h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. A epífese proximal do fêmur foi cortada e a medula óssea aspirada com 1 ml de soro bovino fetal. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para lâmina de vidro onde foi feito o esfregão celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em soluções de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de 15 minutos (Heddle, 1973; Heddle et al., 1983). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas em condições ambientais. Para cada animal foram confeccionadas 3 lâminas sendo duas utilizadas na contagem e uma de reserva. Na determinação de micronúcleos de eritrócitos policromáticos foram analisados 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) e na determinação de citotoxicidade foram computados 1000 EPC e determinada simultaneamente a frequência de eritrócitos normocromáticos (ENC). A confecção das lâminas e a contagem foi realizada pelo procedimento "duplo-cego" e as lâminas foram examinadas em microscópio modelo Olympus BH-2 em objetiva de imersão (10x100).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos e a relação EPC/ENC após administração com óleo de copaíba em diferentes doses e tempos estão apresentados na Tabela 1.

Já se conhece da literatura que o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) apresenta atividade antitumoral em camundongos (Ohsaki et al., 1994). Em estudos realizados anteriormente, Sena & Chen (1998) detectaram a atividade anticolinesterásica do óleo em plasma de camundongos, indicando, dessa maneira, o potencial tóxico desse óleo. A  $DL_{50}$  também foi determinada em camundongos e o valor obtido foi de 8,45 mL/kg de massa corporal (Sena, 1997). Baseando-se nas citadas atividades foi avaliada no presente trabalho a atividade clastogênica e/ou aneugênica do óleo pelo teste de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos bem como a atividade tóxica pela relação da frequência de EPC/ENC.

**TABELA 1.** Frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos e a relação de EPC/ENC após tratamento com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em diferentes doses e tempos

(% ) DL <sub>(50)</sub>	Dose	Tempo (h)	Nº de animais	MN /1000 EPC / animal									Relação EPC/ENC
				Dados individuais									
25	(2,11mL/kg)	24	7	6	5	2	4	5	2	3	3,85 ± 1,45**	0,71	
		48	7	5	3	3	2	4	1	2	2,86 ± 1,24*	0,62	
		72	7	0	3	4	0	2	1	1	1,57 ± 1,39	0,61	
50	(4,22mL/kg)	24	7	4	5	3	3	5	6	4	4,29 ± 1,03 ***	0,78	
		48	7	9	6	3	4	8	5	3	5,43 ± 2,19 ***	0,68	
		72	7	4	5	3	3	5	4	3	3,86 ± 0,83 ***	0,66	
80	(6,76mL/kg)	24	7	11	13	9	9	11	10	16	11,29 ± 2,31 ***	0,61	
		48	7	7	9	6	6	8	6	2	6,29 ± 2,05 ***	0,44	
		72	7	1	2	0	0	2	2	1	1,14 ± 0,83	0,26	
C(-)	H <sub>2</sub> O estéril	48	7	2	0	0	2	0	3	1	1,14 ± 1,24	0,92	
15 C(+)	(86,55mg/kg) ciclofosfamida	48	7	19	21	16	23	21	13	25	19,71 ± 3,80 ***	0,79	

\*P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001 Diferença significativa em relação ao grupo controle(-) ( pelo teste t – Student )  
C(-) controle negativo C (+) controle positivo

Segundo dados da literatura (Yamamoto & Kikuchi, 1980; Tinwell & Ashby, 1991) o tamanho do micronúcleo apresentado pode levar a identificar o sítio de ação do agente indutor, podendo conhecer, assim, se o agente é clastogênico ou aneugênico. No presente trabalho não foi feita a medição do diâmetro do micronúcleo, entretanto os micronúcleos apresentados eram de tamanho relativamente grande, o que leva a sugerir que provavelmente pode se tratar de uma substância que atue ao nível de fuso.

Os resultados obtidos para a dose de 2,11 mL/kg (25% de DL<sub>50</sub>), no tempo de 24 h pós - administração apresentaram uma média de 3,85 MN por 1000 EPC. Pode-se observar que com esta dose o aumento de micronúcleos é modesto em relação ao grupo controle negativo (  $\bar{x} = 1,14$ ), porém estatisticamente significativo (  $p < 0,01$ ). Para a mesma dose com 48 h, a média de MN foi de 2,86. Este resultado indicou que a indução verificada foi muito modesta, porém, ainda assim, mostrou significância estatística (  $p < 0,05$ ). Para o tempo de 72 h, a média de MN obtida foi de 1,57, que foi estatisticamente não significativo em relação ao grupo controle (  $p > 0,05$ ). A diminuição da frequência de micronúcleos no tempo de 72 h possivelmente pode ser atribuída à eliminação gradual do óleo no organismo do camundongo, diminuindo, dessa maneira, a formação de novos micronúcleos. A relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos pode indicar a toxicidade ou não de uma substância no

ensaio. Segundo Mavourmin et al., (1990), a razão entre a frequência de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) decresce quando a substituição dos EPC originados dos eritroblastos é deprimida. Portanto, a diminuição dessa relação (EPC/ENC) pode revelar a citotoxicidade do composto no ensaio. Para a dose de 2,11 mL/Kg, foram obtidos para a razão EPC/ENC os valores de 0,71, 0,62 e 0,61 correspondentes a 24, 48 e 72 horas pós - tratamento. Comparando esses valores com o do grupo controle (0,92) pode-se constatar que esses foram mais baixos, indicando, dessa maneira, a presença da citotoxicidade do óleo de copaíba .

Para a dose de 4,22 mL/kg ( 50% de DL<sub>(50)</sub> ) no tempo de 24 h, foi obtida uma média de 4,29 MN por 1000 EPC. O aumento foi estatisticamente significativo (  $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. No tempo de 48 h a média de frequência de MN detectada foi de 5,43 e este valor foi significativo (  $P < 0,001$  ). Para o tempo de 72 h, verificou-se uma média de 3,86 MN, embora o valor seja inferior aos obtidos nos tempos de 24 e 48 h, foi ainda significativo (  $P < 0,01$ ). A relação verificada entre a frequência de EPC/ENC foi de 0,78, 0,68 e 0,66 correspondentes a 24, 48 e 72 horas pós-administração, mantendo a mesma magnitude em relação à dose anterior (2,11 mL/kg).

Para a dose de 6,76 mL/Kg (80% da DL<sub>(50)</sub>) no tempo de 24 h foi obtida uma média de 11,29 MN /1000 EPC. Este valor é altamente significativo em relação ao grupo controle (  $P < 0,001$ ). No tempo de 48 h a média de MN obtida

foi de 6,29 e o valor foi significativo ( $P < 0,001$ ). Para o tempo de 72 h a média de MN foi de 1,14 e esta não apresentou a significância estatística ( $P > 0,05$ ) em relação ao grupo controle. A modesta frequência de MN constatada possivelmente pode ser atribuída à alta toxicidade do óleo para esta dosagem em 72 h pós-tratados, e esta toxicidade pode ser verificada pela relação EPC/ENC, que é de 0,26. Este valor é muito inferior ao do grupo controle (0,92). Este fato sugere que para dose elevada do óleo de copaíba no tempo de 72 h possivelmente ocorreu uma acentuada depressão do número de EPC, favorecendo, dessa maneira, o aparecimento do maior número de ENC. A baixa relação de EPC/ENC (0,26) indicou uma elevada citotoxicidade e, no entanto, não foi observado um número elevado de MN. Uma possível explicação para justificar este fenômeno é que com dose e tempo de pós-tratamento mais elevados, a eliminação do óleo no organismo do camundongo pode não implicar a recuperação do declínio na frequência de EPC. Este fato fornece indícios de que na dose mais elevada do óleo de copaíba e tempo de tratamento maior possivelmente ocorreu uma inibição acentuada da divisão e/ou maturação das células precursoras dos eritrócitos, como também uma possível "invasão" medular do sangue periférico, prejudicando, dessa maneira, a renovação dos eritrócitos policromáticos, e a relação de EPC/ENC é distorcida em favor do ENC. Assim, os resultados obtidos estão de acordo com esta justificativa e também em concordância com as descrições feitas da literatura (Rabello-Gay et al., 1991). Para os tempos de 24 e 48 h, a relação EPC/ENC foi de 0,61 e 0,44 respectivamente, sinalizando gradativamente uma maior toxicidade para tempos de tratamento mais longo.

## CONCLUSÃO

A presença da atividade mutagênica e tóxica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) foi demonstrada pelo teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos. Foi observado no presente trabalho que a indução da frequência de micronúcleos é dependente da dose. De modo geral, quanto maior a dose, maior é a frequência de MN induzida. Em relação ao tempo de administração, a maior frequência ocorreu no tempo de 24 horas. A atividade tóxica do óleo foi evidenciada em todas as doses administradas.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FUNAPE pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- FREIBURGHHAUS, F., STECK, A., PFANDER, H. et al. Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.61, n.3, p.179-83, 1998.
- HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, v.18, p.187-90, 1973.
- HEDDLE, J. A., HITE, M., KIRKHART, B. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox. *Mutation Research*, v.123, p.61-118, 1983.
- MAVOURNIN, K. H., BLAKEY, D.H., CIMINO, M.C. et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research*, v.239, p.29-80, 1990.
- OHSAKI, A., YAN, L.T., ITO, S. et al. The isolation and in-vivo potent antitumor-activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfii* Desfon. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.4, n.24, p.2889-92, 1994.
- PECKOLT, G. As dez árvores genuinamente brasileiras úteis na medicina. *Revista Flora Medicinal*, v.9, p.453-70, 1942.
- PIO CORREIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1969. v.5.
- RABELLO-GAY, M.N., ROGRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. **Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 241p.
- SENA, M.A. **Atividade tóxica e genotóxica do óleo da *Copaifera langsdorfii* Desfon (Pau do óleo) em camundongos**. 1997. 76p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- SENA, M.A., CHEN, L.C. Avaliação da atividade anticolinesterase do óleo de copaíba em plasmas de camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL 15., 1998, Águas de Lindóia. **Livro de Resumo...** Águas de Lindóia, 1998. p.173.
- TINWELL, H., ASHBY, J. Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*, v.6, p.193-8, 1991.
- YAMAMOTO, K., KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*, v. 71, p.127-31, 1980.