

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

**EFEITOS DA COPAIFERA *LANGSDORFFII* DESF. NA ISQUEMIA-
REPERFUSÃO DE RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS**

FORTALEZA

2007

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

EFEITOS DA COPAIFERA *LANGSDORFFII* DESF. NA ISQUEMIA-
REPERFUSÃO DE RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho
Guimarães

FORTALEZA

2007

S58e Silva, Joaquim José de Lima
Efeitos da *Copaifera langsdorffii* desf. na isquemia-reperusão de retalhos cutâneos randomizados em ratos / Joaquim José de Lima Silva. 2007.
101 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Dissertação (Mestrado)—Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Fabaceae – efeitos de drogas. 2. Antioxidantes. 3. Estresse Oxidativo. 4. Retalhos Cirúrgicos. I. Guimarães, S. B. (Orient.) II. Título.

CDD 615.323322

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

EFEITOS DA COPAIFERA *LANGSDORFFII* DESF. NA ISQUEMIA-
REPERFUSÃO DE RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa
de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em
Cirurgia.

Aprovada em 10/12/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Aragão Ximenes
Universidade Federal do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Antônio Ribeiro da Silva Filho
Faculdade de Medicina Christus

A Jesus Misericordioso, pelo dom da vida; por me acompanhar em todos os momentos, com amor com paciência; por mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães, pela orientação e paciência durante todo o período desse estudo.

Ao Professor Doutor Edilberto Rocha da Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelo fornecimento do óleo-resina de copaíba, utilizado nesse experimento.

Ao Professor Doutor Dalgimar Bezerra de Meneses, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, pela análise histológica dos retalhos de pele dos animais do presente estudo.

Aos brilhantes estudantes de medicina, Gabrielle Gurgel Lima, Sílvia Melo Torres, Gerda Feitosa Nogueira, Raquel Cavalcante de Vasconcelos, Geórgia Barroso Marques, Emanuelle Araújo Belarmino, pela participação na fase experimental desse estudo.

À Srta. Patrícia Lima, estudante do curso de farmácia da Universidade Federal do Ceará, pela participação no preparo das drogas administradas aos animais desse experimento.

À Sra. Marjorie Moreira Guedes, doutoranda de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela participação nos cálculos das drogas administradas aos animais desse estudo.

À Enfermeira Estelita Rodrigues de Barros, pela contribuição no processo de esterilização do instrumental cirúrgico, utilizado nesse experimento.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pela competência, dedicação e atenção dispensados aos alunos de pós-graduação.

Ao Sr. Julião Eymard Vasconcelos Matos, pela colaboração na confecção dos slides para a apresentação oral.

À Srta. Joana Aurélio de Lima, pela contribuição na confecção de gráficos desse estudo.

“É preciso ser forte para se tornar grande: esse é nosso dever. A vida é uma luta da qual não podemos recuar, mas é necessário triunfar”.

Padre Pio de Pietrelcina.

RESUMO

EFEITOS DA COPAIFERA LANGSDORFFII DESF. NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS. JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

O efeito protetor do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foi avaliado, utilizando um modelo experimental de isquemia-reperfusão de retalho cutâneo randomizado no dorso de ratos. Setenta e dois ratos, Wistar, jovens, com peso médio de 216,8g, foram distribuídos ao acaso, em quatro grupos (GCS - controle salina, GCV – controle veículo, GT200 – óleo-resina de copaíba a 200mg/kg, GT400 – óleo-resina de copaíba a 400mg/kg), numericamente iguais e posteriormente redistribuídos em três subgrupos (T-0, T-1 e T-2), com seis animais cada. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob os efeitos de anestesia geral, utilizando-se de uma associação do cloridrato de ketamina (90 mg/kg) com xilazina (10mg/kg), administrados por via intra-peritoneal. Os animais receberam as drogas utilizadas nesse estudo por via oral (gavagem), 24, 12 e 2 horas antes do experimento, no tempo T-1, uma dose pós-operatória e no tempo T-2, seis doses pós-operatórias. Foram determinadas as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) no plasma e tecido; bem como, mieloperoxidase (MPO) no tecido. Para determinação do padrão de distribuição das amostras utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações intragrupais e intergrupais foram feitas utilizando-se os testes de ANOVA/Tukey e Kruskal-Wallis/Dunn. Valores iguais ou menores que $p < 0,05$ foram considerados significantes. O óleo-resina de copaíba nas concentrações de 200mg e 400mg reduziram significativamente as concentrações de TBARS nos tecidos no tempo T24, não ocorrendo redução no plasma. Os níveis de TBARS estavam significativamente elevados nos ratos do grupo GCS comparados aos animais do grupo GCV no tempo de isquemia e durante a reperfusão, demonstrando o dano adicional decorrente do afluxo de sangue oxigenado (reperfusão) ao tecido isquêmico. As concentrações de GSH diminuíram nos ratos tratados com solução salina e aumentaram significativamente no plasma de animais tratados com Tween 80 nos tempos T24 e T48, refletindo uma possível ação anti-oxidante discreta dessa droga. Houve aumento das concentrações de GSH no plasma, quando administrado óleo-resina de copaíba em 200mg e 400mg, e no tecido, óleo-resina de copaíba a 400mg, evidenciando ação anti-oxidante e que, no tecido o efeito é dose-dependente. As concentrações de MPO aumentaram no grupo GCV comparado ao grupo GCS, sugerindo uma atividade pró-inflamatória do Tween 80. A MPO diminuiu quando foi utilizado o óleo-resina de copaíba nas concentrações de 200mg e 400mg, comparados aos grupos GCS e GCV, evidenciando ação anti-inflamatória da mesma. Conclui-se que óleo-resina de copaíba exerce discreta atividade anti-lipoperoxidativa e intensa ação antioxidante durante a isquemia e reperfusão de retalho cutâneo randomizado em ratos.

Palavras-chave: Fabaceae–efeitos de drogas. Antioxidantes. Estresse Oxidativo. Retalhos Cirúrgicos.

ABSTRACT

EFFECT OF COPAIFERA LANGSDORFII (DESF.) IN ISCHEMIA-REPERFUSION OF RANDOM SKIN FLAPS ON RATS. JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA. Dissertation (Master's Degree). Post-graduation Program (Stricto Sensu) in Surgery. Federal University of Ceará. Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

The protective effect of *Copaifera langsdorfii* (Desf.) resin-oil was evaluated on an experimental model of random skin flap on rat's dorsum. Seventy-two young Wistar rats, average weight 216,8g, were randomized in 4 equal (n=18) groups (GCS – Saline control, GCV – vehicle control, GT200 - Test 1 and GT400 – Test 2). Each group was redistributed in 3 subgroups, n=6 animals). All surgical procedures were performed under general anesthesia (ketamine 90 mg+Xylazine 10mg/kg, i.p.) Resin-oil and control drugs (saline and Tween 80) were administered by gavage 24, 12 and 2 hours prior to the beginning of the experiment followed by daily doses for the next 7 days. Tissue and blood samples were collected at the end of the surgical procedure (T-0) and 24 (T24)/168 (T168) hours later. Laboratory analyses included plasma and tissue levels of tiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione (GSH) and tissue levels of myeloperoxidase (MPO). The Kolmogorov-Smirnov test was used for verifying samples homogeneity and comparisons were made using ANOVA/Tukey and Kruskal-Wallis/Dunn tests. P values <0.05 were considered significant. Tissue TBARS levels were significantly increased in T24 time point in rats treated with 200/400mg of resin-oil. Tissue TBARS levels increased and GSH levels decreased significantly in GCS compared with GCV during both ischemia and reperfusion. These findings suggests a possible pro-peroxidative and pro-oxidant effect of the vehicle (Tween 80). Plasma GSH levels increased significantly in T200 and T400 resin-oil treated rats and only in T400 rats tissues. These results point to a dose-dependent anti-oxidative effect of the resin-oil in tissues. MPO levels increased in GCV compared with saline control. This may represent a pro-inflammatory activity of the vehicle used for resin-oil dilution. Anti-inflammatory properties of copaíba oil were demonstrated as MPO concentrations decreased significantly in resin-oil treated rats compared with GCS and GCV.

It is concluded that copaiba resin-oil exerts a discrete anti-lipoperoxidative activity and an intense anti-oxidative activity during ischemia/reperfusion of rat's dorsum random skin flap.

Key-words: Fabaceae. Drug Effects. Antioxidants. Oxidative stress. Surgical Flaps.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	26
Figura 2	Distribuição dos grupos e subgrupos.....	32
Figura 3	Desenho do estudo.....	33
Figura 4	Desenho do retalho cutâneo no dorso do rato.....	35
Figura 5	Retalho cutâneo no dorso do rato, suturado.....	35
Figura 6	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, do grupo controle salina (GCS).....	36
Figura 7	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, do grupo controle veículo (GCV).....	36
Figura 8	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, do grupo teste 1 (GT200).....	36
Figura 9	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, do grupo teste 2 (GT400).....	37
Figura 10	Fluxograma do experimento.....	37
Figura 11	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	43
Figura 12	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	44
Figura 13	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	45
Figura 14	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	46
Figura 15	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	47
Figura 16	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	48
Figura 17	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	49
Figura 18	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	50

Figura 19	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	51
Figura 20	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	52
Figura 21	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	53
Figura 22	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	54
Figura 23	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	55
Figura 24	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	56
Figura 25	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	57
Figura 26	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	58
Figura 27	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	59
Figura 28	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	60
Figura 29	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	61
Figura 30	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	62
Figura 31	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	63

Figura 32	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e GrupoTeste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	64
Figura 33	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	65
Figura 34	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	66
Figura 35	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	43
Tabela 2	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	44
Tabela 3	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	45
Tabela 4	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	46
Tabela 5	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	47
Tabela 6	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g tec. fresco}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	48
Tabela 7	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	49
Tabela 8	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	50
Tabela 9	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	51
Tabela 10	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	52
Tabela 11	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg de tecido fresco}$) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	53
Tabela 12	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg de tecido fresco}$) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	54

Tabela 13	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	55
Tabela 14	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	56
Tabela 15	Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	57
Tabela 16	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/ml}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	58
Tabela 17	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	59
Tabela 18	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	60
Tabela 19	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	61
Tabela 20	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	62
Tabela 21	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	63
Tabela 22	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	64
Tabela 23	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	65
Tabela 24	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	66
Tabela 25	Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm - microMol

$^1\text{O}^2$ - oxigênio singleto

AINE – anti-inflamatório não-esteróide

ATC – ácido tricloroacético

ATP – adenosina trifosfatada

C. – Copaifera

CAPE – éster-fenetil do ácido caféico

CAT – catalase

CEPA – Comissão de Ética em Pesquisa Animal

CIOMS – Council for International Organization of Medical Sciences

CLOH – ácido hipocloroso

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Col. – colaboradores

DTNB – reagente de Ellman

EDTA – etilenodiaminotetracético

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO- espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

GCV – grupo controle veículo

GPx – glutathione peroxidase

GSC – grupo controle salino

GSH – glutathione (forma reduzida)

GSSH – glutathione dissulfeto (forma oxidada)

GT200 – grupo teste 1 (óleo-resina de copaíba a 200mg/kg)

GT400 - grupo teste 2 (óleo-resina de copaíba a 400mg/kg)

H^2O – água

H^2O^2 - peróxido de hidrogênio

H^3PO_4 – ácido fosfórico

HNO^2 - ácido nitroso

$\text{HO}\cdot$ - radical hidroxila

KCL – cloreto de potássio

MDA - malondialdeído
MPO – mieloperoxidase
 N^2O^3 - óxido nitroso
NAC – acetilcisteína
NACG – grupo acetilcisteína
NADP – nicotinamida dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
nm – nanômetro
 $\text{NO}\bullet$ - óxido nítrico
 NO^{2-} - nitritos
 NO^{3-} - nitratos
 O^2 - oxigênio
 $\text{O}^{2\bullet-}$ - radical superóxido
ONOO – peroxinitritos
ORC – óleo-resina de copaíba
RC – retalho controle
RI – retalho isquêmico
 $\text{RO}\bullet$ - radical alcóxila
 $\text{ROO}\bullet$ - radical peróxila
RR – retalho reperfundido
SH – grupos sulfidrílicos
SOD – superóxido dismutase
 SOD^2 - sulfóxido dismutase
SS – solução salina
T-0 – tempo correspondente a 24 horas de pós-operatório
T-1 - tempo correspondente a 48 horas de pós-operatório
T-2 - tempo correspondente a 168 horas de pós-operatório
TBA – ácido tiobarbitúrico
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VO – via oral
XO – xantina-oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVO.....	30
3	MÉTODO.....	31
3.1	Desenho do Estudo.....	33
3.2	O Estudo.....	34
3.2.1	Preparação das drogas utilizadas.....	37
3.2.2	Técnica laboratorial.....	38
3.2.2.1	Preparação dos espécimes (sangue e retalho cutâneo).....	38
3.2.2.2	Avaliação da peroxidação lipídica.....	39
3.2.2.3	Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH).....	40
3.3	Análise Estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	43
4.1	No Plasma.....	43
4.1.1	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo).....	43
4.1.2	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	44
4.1.3	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	45
4.1.4	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	46
4.1.5	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	47
4.1.6	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo).....	48
4.1.7	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	49
4.1.8	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	50
4.1.9	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	51
4.1.10	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico.....	52
4.2	No Tecido.....	53
4.2.1	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo).....	53

4.2.2	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	54
4.2.3	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	55
4.2.4	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	56
4.2.5	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	57
4.2.6	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo).....	58
4.2.7	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	59
4.2.8	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	60
4.2.9	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	61
4.2.10	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	62
4.2.11	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo).....	63
4.2.12	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	64
4.2.13	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	65
4.2.14	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba.....	66
4.2.15	Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba.....	67
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICES.....	93
	ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A restauração das perdas cutâneas, decorrentes de trauma, ressecção tumoral, infecções e/ou necrose por isquemia, continua sendo um grande desafio para a cirurgia plástica, no que diz respeito à manutenção da função e ao aspecto estético. A restauração atinge seu maior grau de dificuldade, quando a área a ser recoberta é extensa ou se localiza em região nobre, como por exemplo, a face. Para a cobertura dessas áreas cruentas, lança-se mão dos retalhos de pele. No entanto, a viabilidade desses retalhos é diretamente relacionada à sua vascularização que, pode ser a partir de uma artéria conhecida, sendo denominado retalho axial, ou confeccionado ao acaso, o retalho randomizado. Estes últimos são mais propensos à necrose, devido à ausência, algumas vezes, de fonte arterial suficientemente capaz de nutrir todo o retalho. Existe, portanto, uma grande dificuldade, em se determinar o tamanho do retalho de pele randomizado, no que concerne à segurança da sua vascularização e, conseqüentemente, à sua viabilidade. No início, era mantida uma relação comprimento X largura, de 1:1, sendo, posteriormente, modificada de acordo com a área operada. Todavia, sabe-se que a necrose desses retalhos está relacionada a fatores extrínsecos e intrínsecos, sendo o fluxo sanguíneo, o principal fator intrínseco e a causa mais freqüente de perdas desses retalhos, por constituir a fonte de sua nutrição. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são classificados em sistêmicos (hipotensão, arteriopatas e infecção); locais (temperatura, compressão e tensão) e os técnicos (planejamento e execução). (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Alguns estudos experimentais em ratos demonstraram que o tempo necessário para a formação do pedículo secundário ocorre em torno de nove dias. O surgimento de hematoma, edema e a própria relação do pedículo versus a área desse pedículo podem acarretar necrose da porção distal do retalho em porcentagens que variam de 9% a 65%, de acordo com o modelo experimental testado (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A necrose de um retalho de pele é uma importante complicação da técnica cirúrgica, de caráter irreversível resultando em perda parcial ou total do retalho. Múltiplos são os fatores envolvidos e as causas básicas são a congestão venosa e a insuficiência arterial. No entanto, vários são os fatores que atuam durante o processo de isquemia: algumas substâncias vasoativas causam vasoespasmo;

ocorre a produção de radicais livres; a bomba de sódio e potássio é inativada; surge edema das células endoteliais ocasionando trombose arterial e venosa. (BITTENCOURT *et al.*, 2005). A agressão isquêmica ocasionada durante a elevação do retalho não é um determinante consistente capaz de conduzir a necrose do mesmo, tendo em vista que, estudos prévios sugerem que a maioria dos tecidos consegue sobreviver com uma média de 10% do seu aporte sanguíneo. Entretanto, algumas mudanças fisiopatológicas referentes à vasoconstricção podem comprometer a viabilidade do retalho. Como exemplo, a liberação de tromboxano A2 pelas plaquetas e o acúmulo de metabólitos tóxicos da vasoconstricção que podem causar lesão tecidual induzida por radicais livres. (HART *et al.*, 2006).

Entretanto, a necrose da parte distal dos retalhos de pele constitui um problema não solucionado, ainda hoje, em cirurgia plástica reparadora e estética. Após a necrose do retalho, a deiscência da ferida cirúrgica, a infecção, a cicatrização retardada da ferida e a formação de fístulas, são complicações secundárias comuns, agravadas por defeitos estéticos e funcionais resultantes de tentativas não bem sucedidas de correção do problema. (HART *et al.*, 2006).

A literatura pesquisada é rica em estudos experimentais em ratos, utilizando modelos de retalhos cutâneos, sejam confeccionados no dorso ou na parte ventral do animal. Muitos retalhos cutâneos randomizados do dorso de ratos têm como base o trabalho de McFarlane (1965), onde era confeccionado um retalho retangular, de base cranial, medindo 10cm de comprimento por 4cm de largura. A partir dessa publicação surgiram outros trabalhos, onde são utilizados retalhos semelhantes, sofrendo modificações nas dimensões ou na base do retalho descrito anteriormente. Outros autores publicaram retalhos da face ventral do animal, denominados retalhos epigástricos. Dentre as várias publicações existentes, observa-se: retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 6 X 2cm (HUEMER *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (FREIRE *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (ZHANG *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 3cm (MCDONALD *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 12 X 3cm (TYNER *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 8 X 2,5 cm (SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 8 X 2cm (ALMEIDA *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X

4cm (ESTEVEES-JÚNIOR; FERREIRA; LIEBANO, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (FONSECA *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (GOMES *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, dividido em quatro retalhos, sendo dois de base cranial e dois de base caudal, medindo cada retalho 5 X 3cm (ATABEY *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 9 X 2cm (SIMMAN; CRAFT; MCKINNEY, 2005), retalhos cutâneos dorsais, em número de dois, de bases caudais, medindo cada um 11 X 2cm (HOSNUTER *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (ABLA *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (CARVALHO *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (MAUAD-JUNIOR *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (AYDOGAN *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 3cm (HART *et al.*, 2006), retalho cutâneo, de base cranial, medindo 10 X 4cm (LIEBANO; ABLA; FERREIRA, 2006), retalho cutâneo dorsal, bipediculado, medindo 8 X 2cm (BEHESHTIAN *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (PRADO *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 7 X 2cm (GRIBBE *et al.*, 2007), retalhos cutâneos epigástricos, em número de dois, de base caudal, medindo cada um 6 X 4cm (FREITAS *et al.*, 2002), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 8 X 8cm (KOMOROWSKA-TIMEK *et al.*, 2004), retalho cutâneo ventral, de base caudal, medindo 8 X 4cm (BITTENCOURT *et al.*, 2005), retalho cutâneo ventral, de base caudal, medindo 6 X 3cm (YOSHIDA; DE CAMPOS, 2005), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 6 X 3cm (COSKUNFIRAT; OZKAN; DIKICI, 2006), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 8 X 8cm (MEIRER *et al.*, 2007), retalho cutâneo epigástrico, modelo de Finseth e Cutting, medindo 7 X 7cm (ERSOY *et al.*, 2007).

A restauração do fluxo sangüíneo, após um período de isquemia, é necessária para a recuperação da função celular normal; por outro lado, a reintrodução do sangue oxigenado nos tecidos isquêmicos pode desencadear lesões teciduais ainda mais intensas do que as provocadas pela isquemia “per se”. Esse agravamento das lesões teciduais foi chamado de “paradoxo do oxigênio”. McCord propôs que o mecanismo responsável por esse agravamento seria a geração de radicais livres de oxigênio conseqüentes à reintrodução de oxigênio molecular.

Sabe-se que radicais livres são gerados na isquemia e reperfusão (FRANCISCO NETO *et al.*, 2005).

A lesão por reperfusão foi descrita, inicialmente, por Cerra *et al.* (1975). O fenômeno “*no-reflow*” está bem documentado na literatura pesquisada e consiste em lesão vascular progressiva durante o processo de reperfusão, associada à uma zona de expansão com fluxo sanguíneo diminuído. May *et al.* (1978) descreveram esse processo a partir de um retalho livre experimental, concluindo que o fenômeno *no-reflow* seria causado por edema celular, agregação intravascular e vazamento de líquido intravascular para o espaço intersticial (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006). A Inflamação e a regeneração de tecidos seguindo a reperfusão atraem células do sistema imune, especialmente, leucócitos polimorfonucleares, contribuindo, também, para a produção de espécies reativas de oxigênio. A seqüência e a extensão desses processos no início da reperfusão desempenham um papel determinante aos órgãos e funções celulares (HAMAR *et al.*, 2003).

A tolerância dos tecidos à agressão isquêmica depende do tipo de tecido e da idade celular. Na fase inicial da isquemia, o ATP é proveniente da glicólise. Entretanto, com certa brevidade, as reservas de glicogênio são depletadas, havendo acúmulo de lactato e outros produtos metabólicos tóxicos. Isso desencadeia a ativação de mediadores químicos e enzimas, as quais inclui a fosfolipase A2 e lisozimas. A fosfolipase A2 converte os fosfolipídios da membrana celular em ácido aracdônico, um precursor dos mediadores inflamatórios, como os leucotrienos e prostaglandinas. As lisozimas, por sua vez, são enzimas proteolíticas que atuam nos agentes patogênicos e células necróticas (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006). Os metabólitos do ácido aracdônico, principalmente os leucotrienos aumentam a adesão dos leucócitos ao leito vascular, acentuando a permeabilidade vascular, uma característica da lesão por reperfusão. As células do endotélio vascular promovem um local de ancoragem para os leucócitos. A atuação dos leucócitos no endotélio envolve a adesão de moléculas, tais como, P-Selectin e L-Selectin e, moléculas de adesão intercelular. Os leucócitos liberam lisozimas, geram espécies reativas de oxigênio e liberam agentes quimiotáticos que recrutam mais leucócitos. Esses fatores são importantes porque animais com depleção de leucócitos apresentam uma lesão de reperfusão diminuída (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção

biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, 2006). O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIRO ;DAVID, 2006).

O radical $\text{HO}\cdot$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (SILVEIRA, 2004; PYTEL *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID, 2006). O exemplo mais comum do ataque de radicais hidroxila a lipídios é a ação deste nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio ($\text{HO}\cdot$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro de radical livre. O carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células (BARREIROS; DAVID, 2006).

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos. O seu tempo de meia vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de H_2O transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio

triplete. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado *quenching* colisional e representa a forma como a água desativa o 1O_2 . Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singleto é maior e, portanto, pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O_2 . O oxigênio singleto reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações são do tipo eno e dieno (reações de Diels-Alder). Os compostos naturais mais reativos frente ao 1O_2 são os carotenóides, devido as múltiplas insaturações conjugadas. Assim, o 1O_2 reage mais lentamente com os ácidos graxos que com o β -caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir (BARREIROS; DAVID, 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila. Ele somente oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos (BARREIROS; DAVID, 2006). O H_2O_2 é gerado in vivo pela dismutação do ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\bullet -}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula.

A atuação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) como oxidante direto é irrelevante. Dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação com o radical $O_2^{\bullet -}$ é a cisteína. A partir dessa reação forma-se um superóxido e o tio-radical. Além disso, o radical ânion superóxido $O_2^{\bullet -}$ presente no organismo é eliminado pela enzima superóxido dismutase, que catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet -}$ em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Este último, quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila. Apesar destes efeitos danosos, o radical $O_2^{\bullet -}$ tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Sabe-se que a região distal dos retalhos cutâneos randomizados constitui um estado de isquemia incompleta, com lesão dos tecidos ocasionada por radicais livres derivados do oxigênio. Um aporte sanguíneo adequado é fundamental para a sobrevivência desses retalhos e fatores como, lesão da vascularização, retalhos mal-desenhados e isquemia-reperfusão, podem levar a necrose parcial ou completa dos mesmos. Uma infiltração sobremaneira significativa dos neutrófilos no músculo esquelético e retalhos de pele já foi demonstrada em modelos animais de experimentação. Muitas tentativas foram realizadas, com o intuito de melhorar a sobrevivência dos retalhos de pele, após lesão por isquemia-reperfusão, utilizando para isso, substâncias que diminuem ou inibem a formação de radicais livres ou danos mediados por neutrófilos (HUEMER *et al.*, 2003; HART *et al.*, 2006).

Todavia, vários agentes farmacológicos foram investigados, no que diz respeito a sua eficácia em prevenir ou reverter a isquemia em retalhos de pele. Simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores de prostaglandinas, glicocorticóides, anticoagulantes e varredores de radicais livres constam entre as drogas que apresentaram melhora na sobrevivência dos retalhos cutâneos (HUEMER *et al.*, 2003). Essas substâncias são a superóxido dismutase exógena (SOD), catalase, alopurinol, vitaminas A, C e E, dexametazona, ciclosporina A, metilprednisolona, azatioprina, heparina, deferoxamina, L-arginina (KOMOROWSKA-TIMEK, 2004), anticorpo monoclonal para molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e cromolin sódico (AYDOGAN *et al.*, 2006), fator de crescimento do endotélio vascular, lidocaína e prilocaína tópicos (EMLA), carnitina, ácido oléico tópico e óxido nítrico (HART *et al.*, 2006), ginkgo biloba (SOUZA FILHO

et al., 2002), aspirina (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002), nonivamida e nicoboxil (HUEMER *et al.*; 2003), lidocaína e epinefrina (ATABEY *et al.*, 2004), propofol (TYNER *et al.*, 2004), sildenafil (SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004; HART *et al.*, 2006), dimetil-sulfóxido (ALMEIDA *et al.*; 2004), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (ESTEVEZ-JUNIOR; FERREIRA; LIEBANO, 2004), terazosina e propranolol (FONSECA *et al.*, 2004), minoxidil (BITTENCOURT *et al.*, 2005), manitol e vitamina C (YOSHIDA; DE CAMPOS, 2005), hidralazina (ESTEVEZ-JUNIOR *et al.*, 2005), acetilcisteína (ABLA *et al.*, 2005), ácido caféico (AYDOGAN *et al.*, 2006), clopidogrel (ERSOY *et al.*, 2007).

A *Copaifera langsdorffii* Desf. (*Leguminosae*) é popularmente denominada copaíba, sendo uma árvore grande que cresce abundantemente no Amazonas, Pará e Ceará, estados do Brasil. Seu óleo-resina (bálsamo de copaíba) é obtido de pequenos cortes da casca do caule da referida planta e utilizado de uma forma popular, para tratamento de várias afecções, dentre as quais, doenças da garganta, dos tratos urinário e pulmonar, úlceras e feridas cutâneas (PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b).

A copaíba tem-se destacado entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população amazônica. Trata-se de uma árvore de grande porte da família *Caesalpiniaceae*, chegando até 30 a 40m de altura. O óleo extraído do seu tronco é constituído, principalmente, por ácido copaífero e cariophileno, além de outros sesquiterpenos (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2005).



Figura 1 – *Copaifera langsdorffii* Desf.
Fonte: Lorenzi (2002)

O óleo de copaíba tem assumido grande importância dentre estas substâncias não só na Região Amazônica como também em outros países para os quais é exportado. Tem sido utilizado por alguns como antiblenorrágico, anticatarral, antiinflamatório e cicatrizante. Por via vaginal é aplicado sob a forma de óvulos para o tratamento de cervicites e leucorréia. A espécie *Copaifera reticulata* Ducke é a mais importante do ponto de vista comercial, uma vez que desta é extraído 70% de todo o óleo comercializado no Brasil. (BRITO *et al.*, 2000). Segundo Lawrence, as espécies botânicas mais frequentemente utilizadas na produção de óleo são: *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) e *C. officinalis* (5%). (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Segundo a última edição do Index Kewensis, o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas só são encontradas no Brasil. (DWYER, 1951; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007). Popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, as copaibas são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2004; PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorfii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (PIO CORRÊA, 1931; WOOD *et al.*, 1940; MORS; RIZNNI, 1966; SOUZA; ABREU, 1977; PERROT, 1994; PINTO *et al.*, 2004; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007). No Brasil, a espécie *C. langsdorfii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída por todo o território (da Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-oeste) e por possuir quatro diferentes variedades: *C. langsdorfii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra*. (LEITE, 1993; PINTO *et al.*, 2004 ; PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

O óleo de copaíba é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Para a utilização farmacológica os óleos mais escuros e viscosos (DUCKE, 1939) são os preferidos (RODRIGUES, 1894; SILVA, 1911; MATTA, 1913; SILVA, 1923; PENNA, 1946; SILVA, 1951; RODRIGUES, 1989). Somente na espécie *C. langsdorfii* o óleo de copaíba apresenta-se vermelho, semelhante ao sangue de dragão (*Croton* sp.), recebendo a denominação popular de copaíba vermelha. (MEDEIROS *et al.*, 1985; MATTOS FILHO *et al.*, 1993; PINTO *et al.*, 2004 ; PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos mostraram a presença de óleos essenciais em torno de 08% (B-cariofileno; óxido de cariofileno; B-elameno; alfa-cis-bergamoteno; ar-curcumeno e alfa-trans-bergamoteno) e uma mistura de diterpenos em torno de 70% (ácidos caurenóico e poliáltico) (PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b). O Quadro 1 relaciona os sesquiterpenos, dipertenos e demais componentes do óleo de copaíba (Anexo A).

Outros estudos farmacológicos demonstraram ações anti-inflamatórias, gastroprotetoras e cicatrizante de feridas cutâneas do óleo-resina; assim como, ações antinociceptiva, antimicrobiana, citotóxico e relaxante muscular suave, efeito do seu maior constituinte diterpeno, o ácido caurenóico (PAIVA *et al.*, 2004).

Na indústria de perfumes o óleo de copaíba é uma matéria-prima importante por ser um excelente fixador, com notas frescas e acres que combinam muito bem com as tradicionais notas florais (SIMONETTI,1991; PINTO *et al.*, 2004, PAIVA *et al* 2004a,2004b; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

O óleo de copaíba é utilizado, também, nas indústrias de cosméticos (FLEURY,1997; PINTO *et al.*, 2004 ; PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007), por suas propriedades emolientes, como bactericida e antiinflamatório, na manufatura de sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus (DEL NUNZIO,1985; PINTO *et al.*, 2004; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007), cremes condicionadores (DEL CASTILHO,1993) loções hidratantes e capilares, para amaciar o cabelo. (SOUZA; ABREU,1977; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2004 ; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Na indústria de vernizes (SIMONETTI,1991), o óleo de copaíba é utilizado na formulação como secativo (WAKAO,1978), substituindo o óleo de linhaça. Na pintura com porcelana, o óleo atua como solvente para as tintas em pó mas como seca rapidamente (2 a 3 dias) deve ser utilizado em conjunto com outros óleos para que a pintura demore mais para secar. Já na pintura em tela, o óleo é utilizado como “amolecedor” de vernizes de pinturas antigas, procedimento que pode gerar diluição também da camada de tinta, prejudicando a pintura (CESAR,1956; MASSCHELEIN-KLEINER,1995). A utilização do óleo de copaíba na indústria de fotografia, como acelerador, também é citada na literatura. (PINTO *et al.*, 2004; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

O Food and Drug Administration (FDA), órgão de regulamentação de drogas e alimentos do governo americano, aprovou o óleo de copaíba em 1972. (PINTO *et al.*, 2004; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Basile *et al.* (1988), realizaram estudo com o óleo de copaíba comparando seu efeito ao da fenilbutazona cálcica, um antiinflamatório não-esteróide (AINE), concluindo que o óleo apresentava eficácia antiinflamatória comparável a este. Mais tarde, Fernandes *et al.* (1992) obtiveram resultados semelhantes, observando a atividade antiinflamatória e analgésica do fitoterápico comparável ao do bisabolol. (NOGUCHI *et al.*, 2002).

Das propriedades atribuídas, foram estudadas ação anti-inflamatória (BASILE *et al.*,1988; PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b), antitumoral (Sarcoma de Walker (OHSAKI *et al.*, 2004) e melanoma (LIMA *et al.*, 2003), anti-ulcerogênico (PAIVA *et al.*, 1998),

anti-oxidante e anti-lipoperoxidativo (PAIVA *et al.*, 2004a,2004b), cercaricida e anti-helmíntico (GILBERT *et al.*, 1972), repelente para insetos (LACEY *et al.*,1981), antimicrobiano (KANG *et al.*, 1992). A indústria cosmecêutica utiliza o óleo de copaíba na fabricação de xampus, loções capilares e espumas para banho (DEL NUNZIO *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 2007).

Não obstante, o excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Sulfóxido Dismutase (SOD2) ou, não enzimaticamente a exemplo de Glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH2. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS, DAVID, 2006).

A glutathione reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Diante do que foi abordado, a necrose dos retalhos de pele, ainda, constitui um desafio ao cirurgião plástico, na tentativa de reparar determinadas lesões decorrentes da perda cutânea. Muitas pesquisas foram feitas, utilizando algumas substâncias, com o intuito de atenuar os efeitos do estresse oxidativo, decorrente do fenômeno de isquemia-reperfusão. Assim, os antioxidantes podem funcionar como um adjuvante terapêutico para os retalhos cutâneos.

Assim sendo, não foram encontrados na literatura pesquisada, achados avaliando o óleo-resina da copaíba na isquemia-reperfusão dos retalhos cutâneos randomizados em dorso de ratos, conferindo ineditismo e relevância a esse estudo.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos antioxidantes da *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre o estresse oxidativo que ocorre na confecção dos retalhos cutâneos randomizados, em ratos.

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA, da Universidade Federal do Ceará, em 21 de novembro de 2006, sob o número 36/06. Foram obedecidas as normas estabelecidas pelo *Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS)* e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Foram utilizados 72 ratos jovens (idade: 60 ± 5 dias), púberes, machos (*Rattus norvegicus* : var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), pesando de 150 a 300g, peso médio 216,48g, (Apêndice A), da linhagem WISTAR, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de ácido inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se em alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os ratos foram, previamente, aclimatados por um período de 7 dias antes da realização do experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

Os 72 ratos foram distribuídos, ao acaso, em quatro grupo ($n = 18$)

Grupo Controle Salina(GCS): Constituído por 18 ratos, tratados com solução salina e submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Grupo Controle Veículo (GCV): Constituído por 18 ratos, tratados com Tween 80 a 2% e submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Grupo Teste 1 (GT200): Constituído por 18 ratos, tratados com óleo-resina de copaíba a 200mg/kg de peso e, submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Grupo Teste 2 (GT400): Constituído por 18 ratos, tratados com óleo-resina de copaíba a 400mg/kg de peso e, submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Os animais de cada grupo foram redistribuídos em três subgrupos, com 06 ratos cada, nomeados de acordo com o tempo de coleta do material para estudo e morte do animal.(T-0; T-1; T-2) Figura – 2

DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS

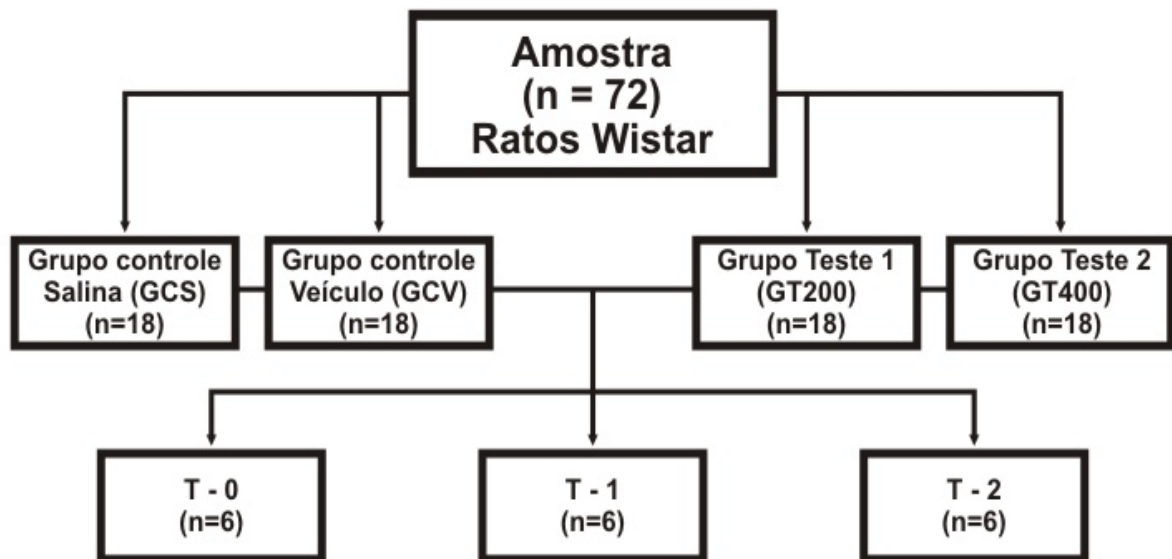


Fig. 02 Distribuição dos grupos e subgrupos, denominados conforme o tipo de droga utilizada na pesquisa e o tempo de coleta das amostras e morte dos animais.

O Grupo Controle Salina (GCS) foi tratado com solução salina a 0,9%, na dose de 5,0ml/kg de peso, sendo 03 doses pré-operatórias (24, 12 e 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo) e após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T- 1 e seis doses para o T – 2, administradas diariamente, VO, por gavagem.

O Grupo Controle Veículo (GCV) foi tratado com uma solução a 2% de Tween 80, na dose de 5,0ml/kg de peso, sendo três doses pré-operatórias 24, 12 e 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo) e após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T- 1 e seis doses para o T – 2, administradas diariamente, VO, por gavagem.

O Grupo Teste 1 (GT200) foi tratado com uma suspensão de óleo-resina de copaíba, em uma concentração de 200mg/kg de peso, com um volume de 05ml/kg

de peso corporal, sendo 03 doses pré-operatórias (24, 12 e 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo) e após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T-1 e seis doses para o T – 2, administradas diariamente, VO, por gavagem.

O Grupo Teste 2(GT400) foi tratado com uma suspensão de óleo-resina de copaíba, em uma concentração de 400mg/kg de peso, com um volume de 05ml/kg de peso corporal, sendo 03 doses pré-operatórias (24, 12 e 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo) e após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T-1 e seis doses para o T – 2, administradas diariamente, VO, por gavagem.

Como o óleo-resina de copaíba é insolúvel em água, realizou-se uma diluição prévia em Tween 80 a 2% e, posterior suspensão em água destilada; fato esse que resultou na avaliação do Tween 80 isoladamente, com o intuito de verificar ou não, sua atuação como anti-oxidante.

3.1 Desenho do Estudo (Figura 3)



Figura 3 – Desenho do estudo – Pré e pós-tratamento com solução salina (SS), tween 80 a 2% e óleo-resina de copaíba a 200mg/kg e 400mg/kg, por via oral (gavagem) – O tempo 0 corresponde a primeira cirurgia (confecção do retalho cutâneo) -As coletas foram realizadas por ocasião da segunda cirurgia e morte dos animais.

O estudo foi realizado no mesmo horário do dia, em cada grupo experimental, para evitar-se a variação circadiana das respostas.

3.2 O Estudo

Os ratos de cada grupo foram pesados individualmente, ao início do experimento, para obtenção do cálculo dos volumes das diversas substâncias administradas durante o experimento. Tendo sido realizado o cálculo, obteve-se o volume das soluções a serem administradas, via oral, por gavagem, para cada animal. Os animais permaneceram em jejum, com oferta de água, a partir de 12 horas que antecederam o procedimento cirúrgico.

A técnica anestésica utilizada foi a combinação da ketamina (90mg/kg de peso corporal), associada à xilazina (10mg/kg de peso corporal), administrados por via intraperitoneal, mantendo um plano anestésico satisfatório à realização do procedimento cirúrgico. A profundidade anestésica foi avaliada por parâmetros clínicos, como as freqüências cardíacas e respiratórias, movimentos das narinas ou outros grupos musculares, o que evidencia superficialização do plano anestésico.

Atingindo o plano anestésico satisfatório, o animal era submetido à epilação da região dorsal e colocado sobre uma prancha de madeira revestida por uma lâmina de plástico fenólico, com extensão das quatro patas e em decúbito ventral. Em seguida, era demarcado o retalho de pele, de forma retangular, medindo 8,0cm de comprimento por 2,5cm de largura, de base caudal, tendo como parâmetro anatômico, as cristas ilíacas. Esse retalho foi uma modificação da técnica descrita por McFarlane (1965) e utilizado por Sarifakioglu *et al.* (2004). A marcação do retalho foi realizada com tinta permanente®. Após a marcação do retalho, fez-se antissepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo, foram colocados campos cirúrgicos e em seguida, com bisturi de lâmina 15, a pele foi incisada e o retalho cutâneo foi elevado, incluindo o panículo carnoso, equivalente ao tecido subcutâneo em humano, e logo em seguida, reposicionado e suturado na área receptora que coincidiu com a área doadora do mesmo, com fio de nylon 5-0, pontos separados. Após o ato operatório, os animais foram recolocados nas respectivas gaiolas.

Durante o experimento, foram realizadas duas intervenções cirúrgicas em todos os grupos: A primeira que, consistiu na confecção dos retalhos cutâneos (elevação e reposicionamento na área receptora); a segunda que teve como objetivo, a coleta de material para análise laboratorial, efetuada de acordo com os tempos para coleta (T -0; T -1; T -2).

Para a coleta de material, o animal foi anestesiado, conforme descrição acima, em seguida, colocado sobre a prancha de madeira, revestida de plástico fenólico, em decúbito ventral, onde foi retirada a parte central do retalho de pele e congelada em nitrogênio líquido; em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal, onde foi submetido a uma laparotomia, com identificação da artéria aorta, em sua bifurcação nas artérias ilíacas e colhido sangue para análise laboratorial, ao nível dessa bifurcação; sendo que, no retalho cutâneo, foram dosadas as concentrações de TBARS, Glutathione e Mieloperoxidase e, no sangue, TBARS e Glutathione. Essa coleta foi realizada com 24 horas, após a confecção dos retalhos de pele, para os subgrupos T – 0; com 48 horas para os subgrupos T – 1; e com 168 horas para os subgrupos T – 2. Após a coleta do sangue, os animais foram mortos por hipovolemia.

As figuras 4,5,6,7,8 e 9 mostram o desenho do retalho, após a sutura do mesmo e no 7º. dia de pós-operatório, onde foi identificada necrose da parte distal do mesmo.



Figura 4 – Demarcação do retalho cutâneo no dorso do rato 01 GCS



Figura 5 – Retalho cutâneo suturado, no dorso do rato 02 do GCS.

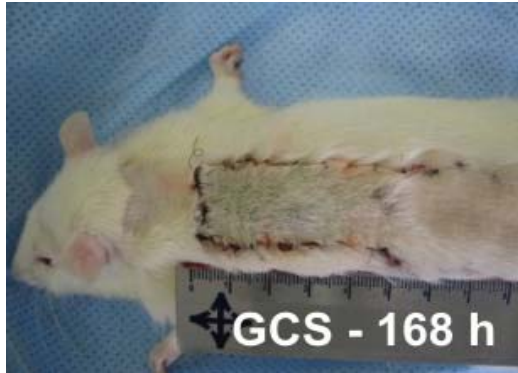


Figura 6 – Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo controle salina (solução salina).



Figura 7 - Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo controle veículo (Tween 80 a 2%).



Figura 8 - Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo teste 1 (óleo-resina de copaíba a 200mg/kg de peso).



Figura 9 - Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo teste 2 (óleo-resina de copaíba a 400mg/kg de peso).

O fluxograma apresentado, abaixo, mostra as etapas cirúrgicas do experimento. (Figura 10)

DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO



Fig. 10 Fluxograma do experimento

3.2.1 Preparação das substâncias utilizadas

A solução salina (0,9%) utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza-Ce). O Tween 80 utilizado foi produzido por Riedel-de Haen (Alemanha). A quantidade de 1l correspondia a 1,08Kg. Para utilização nos animais, do grupo controle veículo (GCV), preparou-se uma solução de Tween 80 a 2%, em água destilada. A solução resultante permitiu padronizar as dosagens empregadas, utilizando como parâmetro, 05ml/kg de peso do rato. Cada

rato recebeu a dose calculada de acordo com seu peso, 24h, 12h e 2h antes do ato cirúrgico e de acordo com o subgrupo, variando de uma a seis doses no pós-operatório.

A *Copaifera langsdorffii* Desf. e seu óleo-resina foram oriundos do Crato-Ce, identificados pela equipe do Professor Afrânio G. Fernandes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. O óleo-resina de copaíba foi analisado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela equipe do Professor Edilberto Rocha Silveira. O óleo-resina de copaíba foi preparado da seguinte maneira, para ser administrado aos animais: Cada grupo de animal foi inicialmente pesado. De posse do peso total do grupo, foi preparada solução suficiente para a administração de 24 e 12 horas antes do experimento (as doses de 2 horas antes do experimento, assim como as posteriores à cirurgia foram preparadas como doses únicas). O parâmetro utilizado foi de 0,5ml/100g de peso do animal. No grupo GT400mg/Kg, para a obtenção dessa proporção em 0,5ml/100g de peso do animal, foi pesado em balança analítica de precisão 80mg de ORC para cada mL de solução em um gral. Verificado o peso total dos animais e a quantidade de volume a ser preparada, foi então pesada quantidade de óleo-resina de copaíba (ORC) suficiente para a administração de 24 e 12h. À essa solução foi acrescentada Tween 80 a 2% para auxiliar na solubilização do óleo (Ex. 35ml de solução, 0,7ml de Tween 80+ 34,3ml de solução). O procedimento se deu da seguinte forma: ORC foi pesado e solubilizado com Tween 80 e, em seguida, a água (em volume já determinado) foi acrescentada. No grupo GT200mg/Kg, foram obedecidos os mesmos critérios citados acima, entretanto a quantidade pesada foi de 40mg de ORC para cada ml de solução. A administração aos animais foi semelhante ao grupo veículo de suspensão.

3.2.2 Técnica Laboratorial

3.2.2.1 Preparação dos espécimes (sangue e retalho cutâneo)

Os tubos de ensaio, contendo sangue arterial heparinizado (4,0ml), foram colocados em centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i (França) e, centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10°C. O

plasma, assim, obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a -70 °C.

O terço médio do retalho de pele foi removido e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido, a cerca de cento e noventa graus centígrados negativos. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material, utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos, em número variável, foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a 70 graus centígrados negativos, até sua utilização.

3.2.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica

A técnica teve por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA), formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se, a seguir, a extração desse composto, usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que, foi expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Utilizou-se no presente estudo, para a quantificação do teor de TBARS no tecido (retalho de pele) o teste de Uchiyama e Mihara (1978), semelhante ao acima descrito, onde a concentração de TBARS foi expressa em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no retalho de pele.

O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico, originando um composto de cor rosa.

Reagentes

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-butanol

Procedimento

O teor de TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), frequentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido (retalho de pele), a ser analisado, foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C, imediatamente após a coleta. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado, 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5ml de cada

amostra e acrescentou-se 1,0ml de solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo, seguido de adição de 4,0ml de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton – Califórnia) a 520nm e 535nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão, adrede preparada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco.

3.2.2.3 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)

A determinação dos grupos SH foi realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

Drogas e reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC 50%)

Tampão TRIS 0,4M ph 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 0,5M

Metanol

Glutathiona (GSH, 1mg/ml).

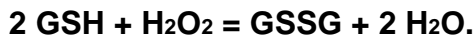
Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na_2 0,2M PM 372,2(%), 211g + H_2O *qsp* 70,0ml)

EDTA Na_2 0,02M (30ml de EDTA Na_2 0,2M + H_2O *qsp* 300ml)

Reação



Procedimento:

A amostra de retalho de pele foi pesada e homogeneizada em 5ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Foram retirados 4,0ml do homogenato e misturou-se com 3,2ml de água destilada e 0,8ml de ácido tricloroacético a 50%. O tubo foi agitado e centrifugado a 3000g por 15 minutos. Foram retirados 2,0ml do sobrenadante e acrescentou-se 4,0ml de TRIS 0,4M (pH 8,9) e 1,0ml de DTNB 0,01M; agitou-se a mistura para homogeneização. Em seguida foram lidas as absorbâncias no espectrofotômetro a 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

Determinação da mieloperoxidase no retalho de pele:

Pesou-se 0,5mg do HTAB/100ml de tampão fosfato 50mM (pH 6,0). Em seguida, foi pesado 50mg de retalho de pele, macerou-se esse tecido com nitrogênio líquido e, colocou-se no tampão com HTAB (pH 6,0). Após esse procedimento, obteve-se o homogenato que passou por três ciclos de congelamento e descongelamento a -70°C, durante 5 minutos cada um. Em seguida, colocou-se no freezer -70°C e, após 5 minutos, retirou-se a amostra e levou-se ao sonicador até descongelar, em 3 ciclos. Depois desse procedimento, centrifugou-se a amostra a 3000 r.p.m., durante 15 minutos. Acrescentou-se O-dionisidine ao tampão fosfato e por último o peróxido de hidrogênio. Finalmente, fez-se a leitura no tempo zero e com cinco minutos.

3.3 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados (Apêndice C) onde foram determinadas as curvas de normalidade aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e calculados a média amostral e o desvio padrão.

Comparações transversais foram realizadas entre os diversos subgrupos (T-0, T-1 e T-2) com os respectivos controles (diferentes animais, nos mesmos momentos), utilizando-se testes paramétricos, após comprovação da normalidade da distribuição das variáveis (teste *t* de Student).

ANOVA com comparações *post hoc* (teste de Tukey-Kramer) foi utilizada para comparações múltiplas entre os subgrupos (diferentes animais em momentos diferentes).

O teste de Kruskal-Wallis / Dunn foi utilizado para comparações entre os grupos Controle e os grupos teste e comparações intergrupais, quando se verificaram dados não paramétricos.

O Teste de Kolmogorov-Smirnov também foi utilizado para determinação da normalidade ponderal dos animais utilizados no experimento.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se os programas de análise estatística *GraphPad InStat® versão 3.00* e *GraphPad Prism® versão 4.00* para *Windows*, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A.*

Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$), assinalando-se com o símbolo [] os valores significantes nas comparações inter-grupais e com os símbolos [+, ‡, #] nas comparações das variações temporais entre os diversos subgrupos (T24, T48 e T168) do mesmo grupo.

4 RESULTADOS

4.1 No Plasma

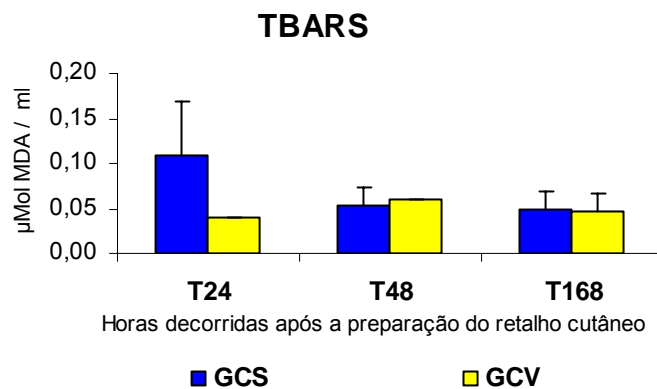
4.1.1 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo)

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de TBARS comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 1, Figura 11).

Tabela 1 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	0,110 \pm 0,06	0,054 \pm 0,02	0,048 \pm 0,02
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,041 \pm 0,00	0,060 \pm 0,00	0,047 \pm 0,02

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

Figura 11 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

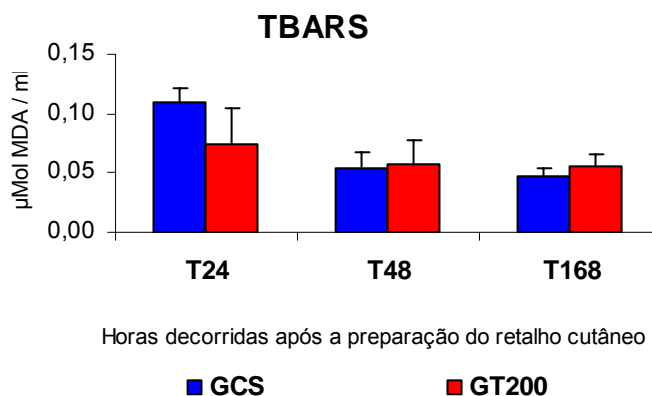
4.1.2 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de TBARS comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200) (Tabela 2, Figura 12).

Tabela 2 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	0,110 \pm 0,06	0,054 \pm 0,02	0,048 \pm 0,02
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT200	0,075 \pm 0,03	0,058 \pm 0,02	0,055 \pm 0,01

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskall Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

Figura 12 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.3 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba

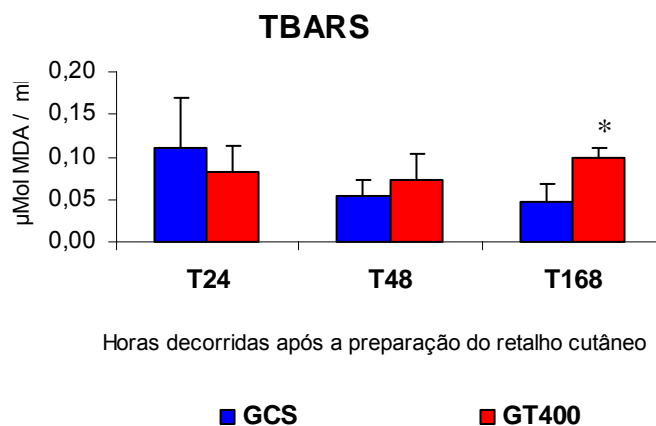
Houve aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TBARS no GT400 no tempo T168, comparado ao respectivo controle (GCS) (Tabela 3, Figura 13).

Tabela 3 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	0,110 \pm 0,06	0,054 \pm 0,02	0,048 \pm 0,02
Tween 80 + Óleo-Resina 400 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	0,082 \pm 0,03	0,074 \pm 0,03	0,100 \pm 0,01*

Testes: Kruskal Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS



Testes: Kruskal Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

Figura 13 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

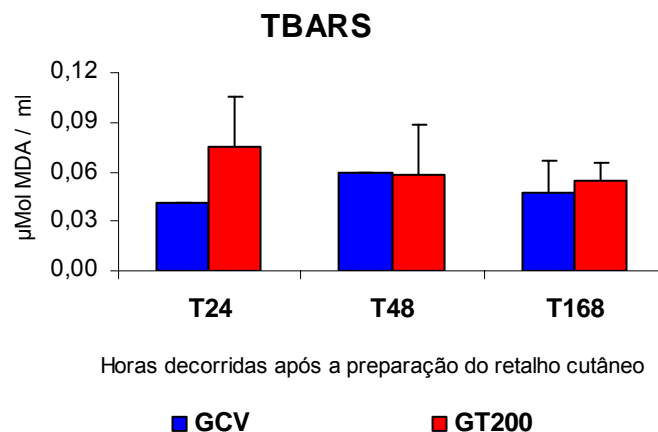
4.1.4 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de TBARS comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200) (Tabela 4, Figura 14).

Tabela 4 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,041 \pm 0,00	0,060 \pm 0,00	0,047 \pm 0,02
Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT200	0,075 \pm 0,03	0,058 \pm 0,02	0,055 \pm 0,01

Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

Figura 14 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.5 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba

Houve aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TBARS no GT400 nos tempos T24 e T168, comparados aos respectivos controles (GCV) (Tabela 5, Figura 15).

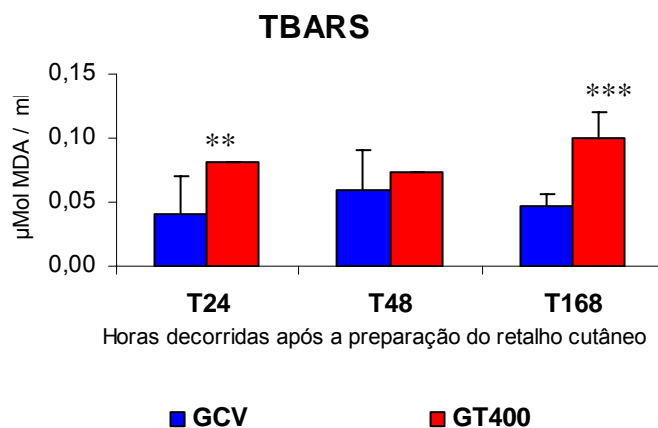
Tabela 5 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,041 \pm 0,00	0,060 \pm 0,00	0,047 \pm 0,02
Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	0,082 \pm 0,03 **	0,074 \pm 0,03	0,100 \pm 0,01 ***

Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV



Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

Figura 15 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.6 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo)

Houve aumento significativo das concentrações de GSH no GCV, comparado ao GCS, nos tempos T24 e T48 (Tabela 6, Figura 16).

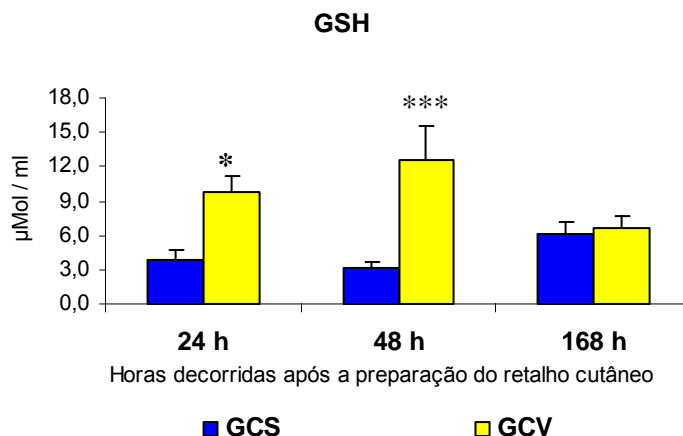
Tabela 6 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g tec. fresco}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	3,780 \pm 0,89	3,120 \pm 0,49	6.050 \pm 1,19
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	9,840 \pm 1,36*	12,600 \pm 3,01***	6,590 \pm 0,48

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

* $p < 0,05$ comparado ao GCS

*** $p < 0,001$ comparado ao GCS



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

* $p < 0,05$ comparado ao GCS

*** $p < 0,001$ comparado ao GCS

Figura 16 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.7 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba

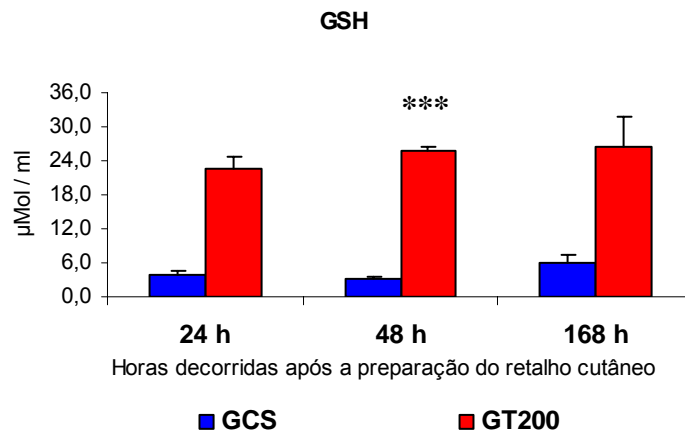
Houve aumento significativo das concentrações de GSH no GT200, comparado ao GCS, no tempo T48 (Tabela 7, Figura 17).

Tabela 7 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	GCS	3,780 \pm 0,89	3,120 \pm 0,49	6.050 \pm 1,19
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperfusão	GT200	22,60 \pm 2,14	25,60*** \pm 1,02	26,60 \pm 5,09

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

Figura 17 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.8 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

Houve aumento significativo das concentrações de GSH no GT400, comparado ao GCS, nos tempos T24 e T48 (Tabela 8, Figura 18).

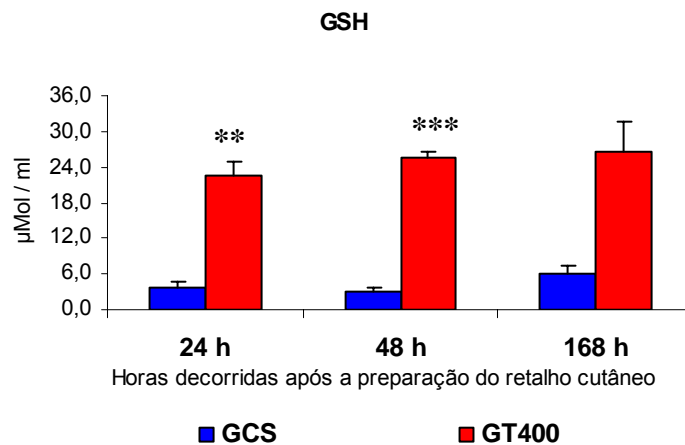
Tabela 8 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	3,780 \pm 0,89	3,120 \pm 0,49	6.050 \pm 1,19
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	19,60 \pm 0,69**	23,30 \pm 8,38***	13,90 \pm 2,84

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

*** $p < 0,0001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

*** $p < 0,0001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

Figura 18 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.9 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

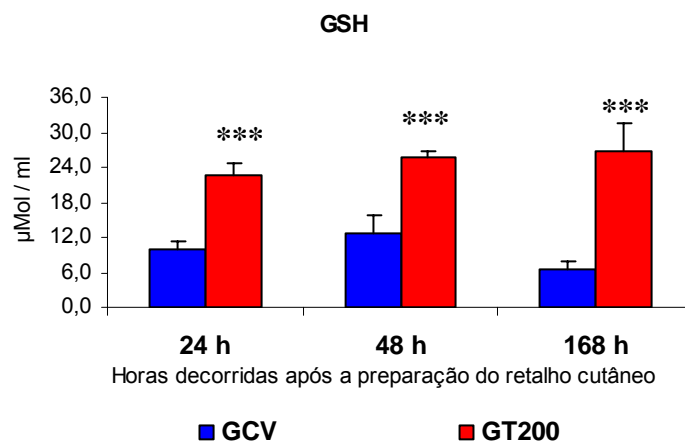
Houve aumento significativo das concentrações de GSH no GT200, comparado ao GCV, em todos os tempos estudados (Tabela 9, Figura 19).

Tabela 9 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol} / \text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperfusion Tween 80 + Óleo-	GCV	9,840 \pm 1,36	12,600 \pm 3,01	6.590 \pm 1,17
Resina 200 mg + Isquemia/Reperfusion	GT200	22,60 \pm 2,14***	25,60 \pm 1,02***	26,60 \pm 5,09***

Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV



Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

Figura 19 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol} / \text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.1.10 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

Houve aumento significativo das concentrações de GSH no GT400, comparado ao GCV, em todos os tempos estudados (Tabela 10, Figura 20).

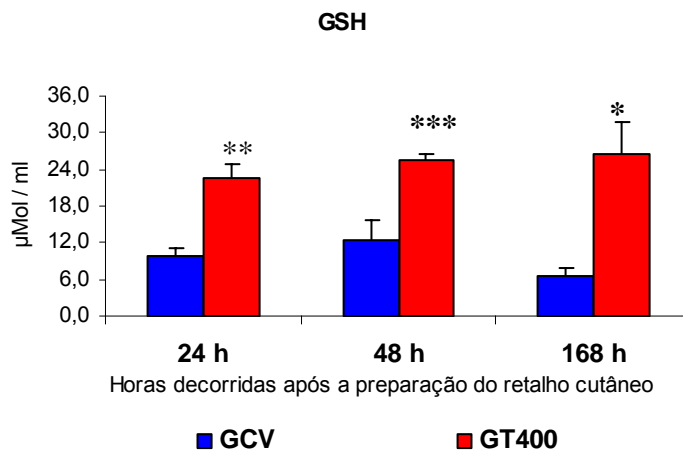
Tabela 10 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão Tween 80 + Óleo-	GCV	9,840 \pm 1,36	12,600 \pm 3,01	6.590 \pm 1,17
Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	19,60 \pm 0,69**	23,30 \pm 8,38***	13,90 \pm 2,84*

Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV



Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

Figura 20 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) no plasma, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2. No Tecido

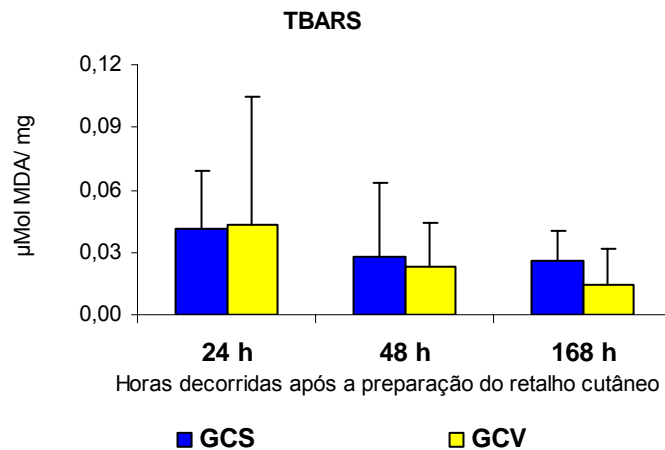
4.2.1 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo)

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de TBARS comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 11, Figura 21).

Tabela 11 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	0,042 \pm 0,027	0,028 \pm 0,035	0,026 \pm 0,015
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,043 \pm 0,061	0,023 \pm 0,021	0,014 \pm 0,017

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

Figura 21 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.2 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba

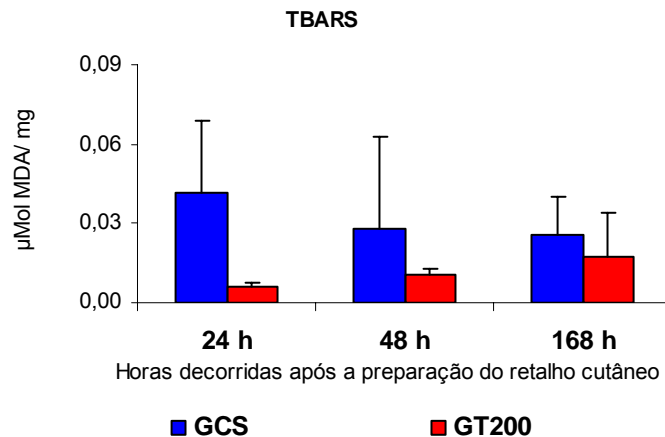
Houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS , no T24 comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200) (Tabela 12, Figura 22).

Tabela 12 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	GCS	0,042 \pm 0,027	0,028 \pm 0,035	0,026 \pm 0,015
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperfusão	GT200	0,006 \pm 0,027 **	0,035 \pm 0,00	0,026 \pm 0,014

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo GCV



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo GCV

Figura 22 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

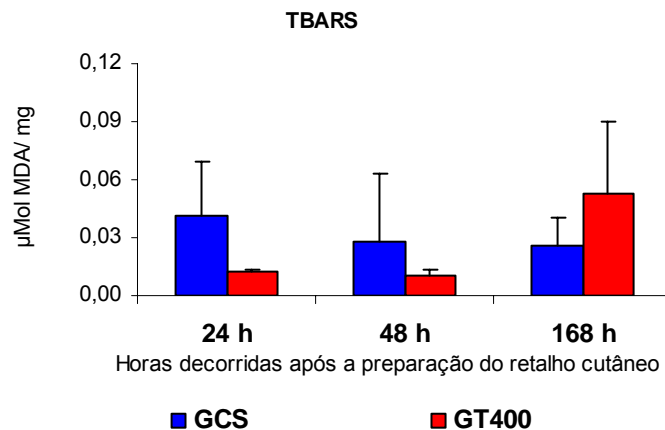
4.2.3 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS , no T24 comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400) (Tabela 13, Figura 23).

Tabela 13 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperfusion	GCS	0,042 \pm 0,027	0,028 \pm 0,035	0,026 \pm 0,015
Tween 80 + Óleo-Resina 400 mg + Isquemia/Reperfusion	GT400	0,012 \pm 0,001 *	0,010 \pm 0,003	0,053 \pm 0,014

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

Figura 23 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

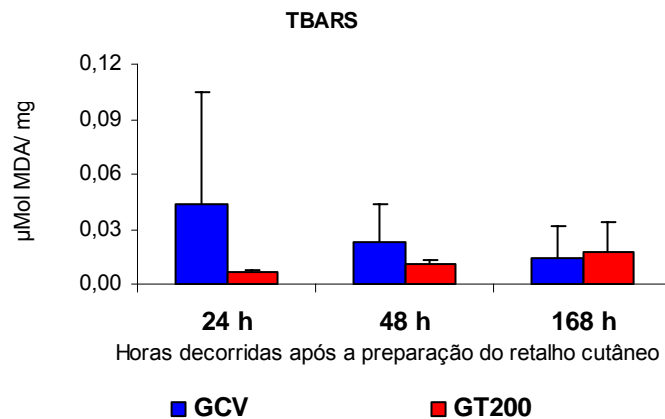
4.2.4 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS, no T24 comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200) (Tabela 14, Figura 24).

Tabela 14 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,043 \pm 0,061	0,023 \pm 0,021	0,014 \pm 0,017
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT200	0,006 \pm 0,027**	0,035 \pm 0,00	0,026 \pm 0,014

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

Figura 24 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.5 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba

Houve aumento significativo nas concentrações teciduais de TBARS no GT400 no tempo T168 comparado ao respectivo controle (GCV) (Tabela 15, Figura 25).

Tabela 15 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no retalho cutâneo, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	0,043 \pm 0,061	0,023 \pm 0,021	0,014 \pm 0,017
Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	0,012 \pm 0,010	0,010 \pm 0,021	0,053 \pm 0,028*

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

* $p < 0,05$ comparado ao GCV

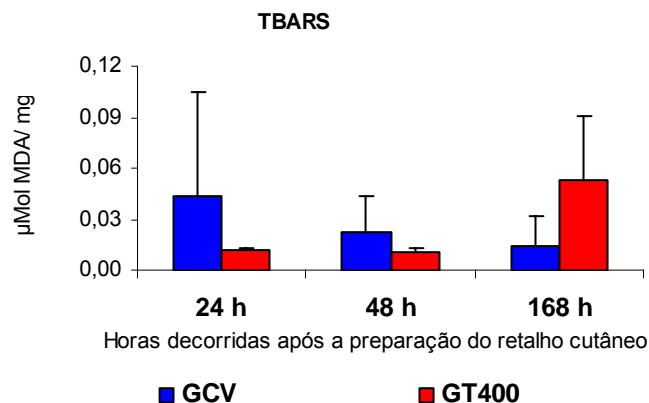


Figura 25 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

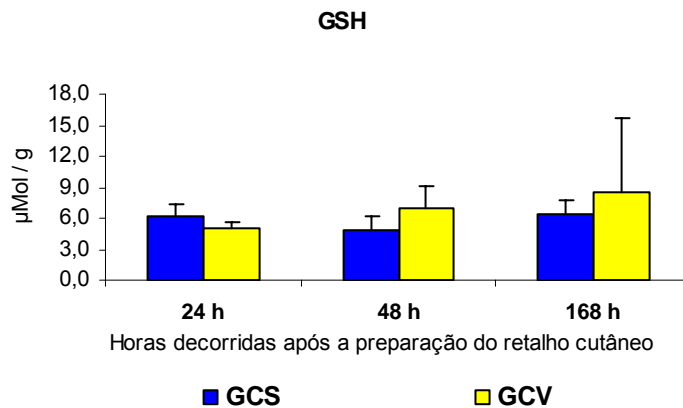
4.2.6 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo)

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de GSH comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 16, Figura 26).

Tabela 16 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/ml}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	6,27	\pm 1,05	4,80	\pm 1,42	6,34	\pm 1,42
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	5,05	\pm 0,57	6,99	\pm 2,19	8,55	\pm 7,22

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

Figura 26 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

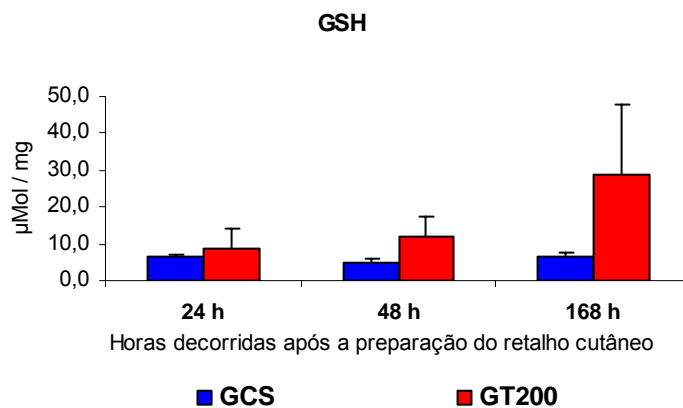
4.2.7 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de GSH comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200) (Tabela 17, Figura 27).

Tabela 17 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GCS	6,27	\pm 1,05	4,80	\pm 1,42	6,34	\pm 1,42
	GT200	8,93	\pm 5,00	11,90	\pm 5,31	28,80	\pm 19,00

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskall Wallis / Dunn, em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P.)

Figura 27 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.8 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba

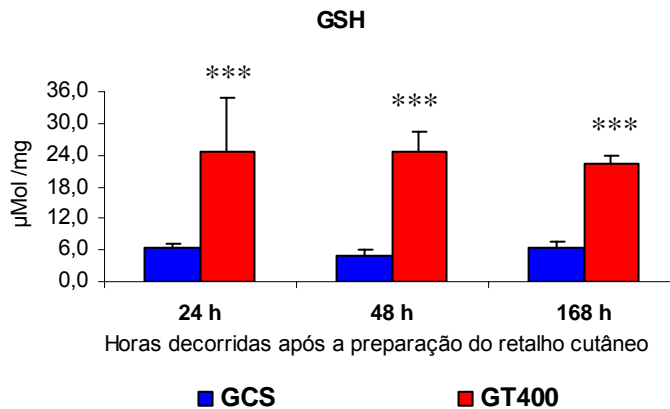
Houve aumento significativo nas concentrações teciduais de GSH no GT400 em todos os tempos, comparados ao respectivo controle (GCS) (Tabela 18, Figura 28).

Tabela 18 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	6,27	\pm 1,05	4,80	\pm 1,42	6,34	\pm 1,42
Tween 80 + Óleo-Resina 400 mg + Isquemia/Reperusão	GT400	25,40	\pm 10,20 ^{***}	24,70	\pm 3,90 ^{***}	22,50	\pm 1,48 ^{***}

Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS



Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)
 *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle no grupo GCS

Figura 28 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

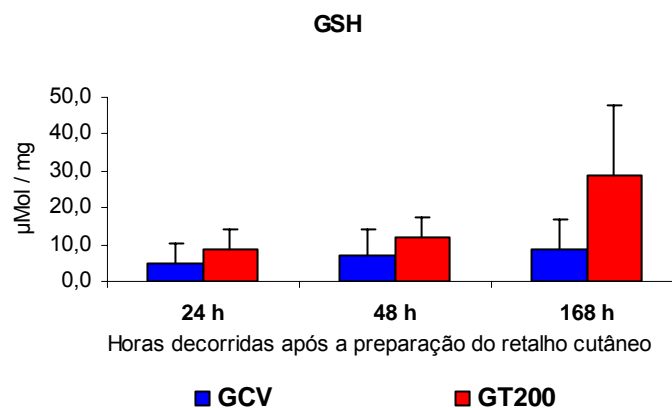
4.2.9 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de GSH comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200) (Tabela 19, Figura 29).

Tabela 19 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Tween 80 + Isquemia/Reperfusão	GCV	5,05 \pm 0,57	6,99 \pm 2,19	8,55 \pm 7,22
Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperfusão	GT200	8,93 \pm 5,00	11,90 \pm 5,31	28,80 \pm 19,00

Testes: ANOVA /Tukey em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

Figura 29 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com Tween 80 ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.10 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba

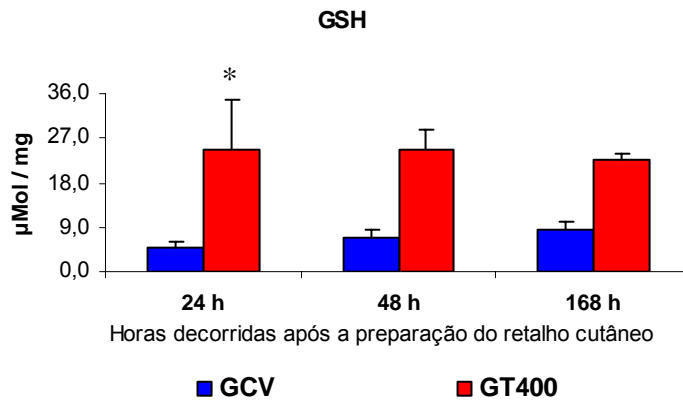
Houve aumento significativo nas concentrações teciduais de GSH no GT400 no tempo T24 comparado ao respectivo controle (GCV) (Tabela 20, Figura 30).

Tabela 20 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Tween 80 + Isquemia/Reperfusão	GCV	5,05	\pm 0,57	6,99	\pm 2,19	8,55	\pm 7,22
Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperfusão	GT400	24,50	\pm 10,20 *	24,70	\pm 3,90	22,50	\pm 1,48

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle no grupo GCV

Figura 30 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste2 (GT400), pré-tratados com Tween 80 ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.11 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo)

Houve aumento significativo das concentrações de MPO nos tempos T24 e T48 no GCV, comparado ao GCS. Houve aumento significativo das concentrações de MPO no T168 comparado ao T24 e ao T48 no GCS. (Tabela 21, Figura 31).

Tabela 21 – Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCS	0,70 ± 0,23	0,71 ± 0,10	4,17 ± 1,06 ⁺⁺⁺
Tween 80 + Isquemia/Reperusão	GCV	3,80 ± 0,25 ^{***}	1,92 ± 0,66 ^{*†††}	1,72 ± 0,64 ^{***†††}

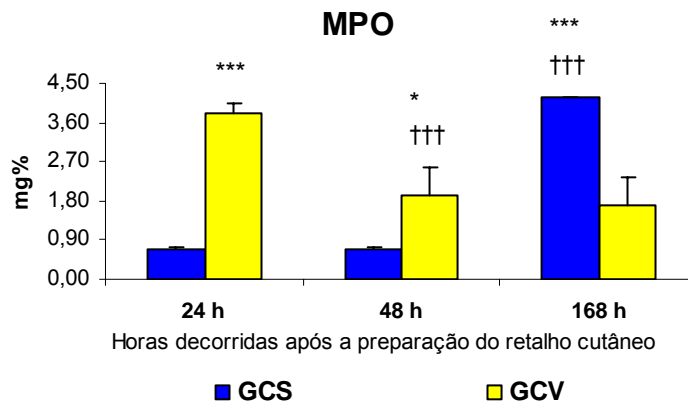
Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

*** p<0,001 comparado ao grupo GCS

* p<0,05 comparado ao grupo GCS

††† p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS

††† p<0,001 comparado ao T24 no GCV



Testes: ANOVA / Tukey em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

*** p<0,001 comparado ao grupo GCS

* p<0,05 comparado ao grupo GCS

††† p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS

††† p<0,001 comparado ao T24 no GCV

Figura 31 - Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.12 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa da MPO no GT200 no T168 comparado ao respectivo controle (GCS). Não foram observadas diferenças intragrupais (Tabela 22, Figura 32).

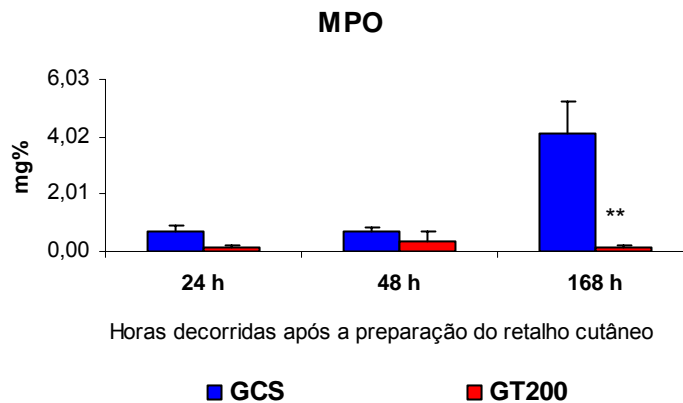
Tabela 22 – Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão Tween 80 + Óleo- Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GCS	0,70	± 0,23	0,71	± 0,10	4,17	± 1,06 ⁺⁺⁺
	GT200	0,13	± 0,05	0,34	± 0,34	1,15	± 0,03 ^{**}

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

** p<0,01 comparado ao grupo GCS

+++ p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

** p<0,01 comparado ao grupo GCS

+++ p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS

Figura 32 - Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e GrupoTeste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.13 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com solução salina ou 400mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa da MPO no GT400 no T168 comparado ao respectivo controle (GCS). Não foram observadas diferenças intragrupais (Tabela 23, Figura 33).

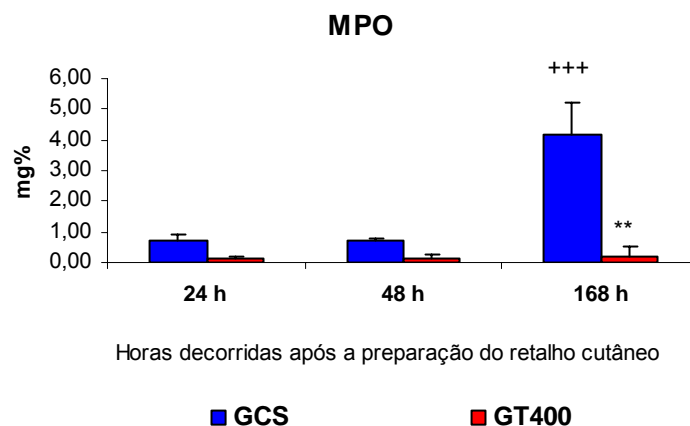
Tabela 23 – Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e e Teste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão Tween 80 + Óleo- Resina 400 mg + Isquemia/Reperusão	GCS	0,70	± 0,23	0,71	± 0,10	4,17	± 1,06 ⁺⁺⁺
	GT400	0,15	± 0,03	0,34	± 0,16	0,20	± 0,20 ^{**}

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

** p<0,01 comparado ao grupo GCS

⁺⁺⁺ p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

** p<0,01 comparado ao grupo GCS

⁺⁺⁺ p<0,001 comparado ao T24 e T48 no GCS

Figura 33 - Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.14 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações plasmáticas de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 200mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa da MPO no GT200 no T24 comparado ao respectivo controle (GCV). Houve diminuição significativa da MPO no T48 ($1,92 \pm 0,27$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$) e no T168 ($1,72 \pm 0,26$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$), no GCV (Tabela 24, Figura 34).

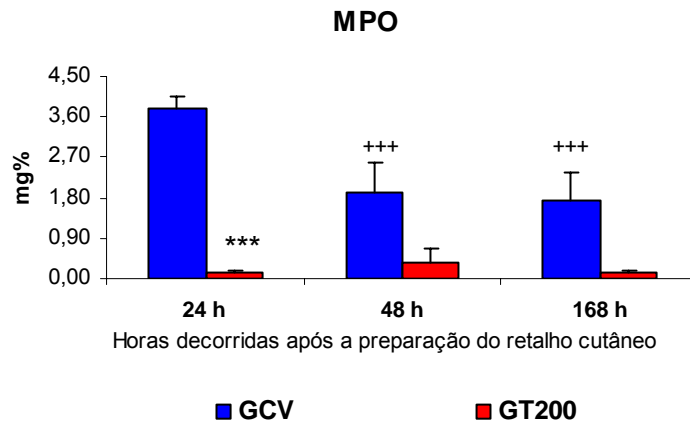
Tabela 24 – Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou 200 mg de óleo-resina de copaíba e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo		
		T24	T48	T168
Solução salina + Isquemia/Reperusão	GCV	3,80 ± 0,25	1,92 ± 0,66 ⁺⁺⁺	1,72 ± 0,64 ⁺⁺⁺
Tween 80 + Óleo-Resina 200 mg + Isquemia/Reperusão	GT200	0,13 ± 0,05 ⁺⁺⁺	0,34 ± 0,34	1,15 ± 0,03

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

*** p<0,001 comparado ao grupo GCV

*** p<0,001 comparado ao T24 no GCV



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média ± D.P)

*** p<0,001 comparado ao grupo GCV

*** p<0,001 comparado ao T24 no GCV

Figura 34 - Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste1 (GT200), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

4.2.15 Efeitos do trauma anestésico, cirúrgico, isquêmico e da reperfusão sobre as concentrações teciduais de mieloperoxidase (MPO) em ratos pré-tratados com Tween 80 (veículo) ou 400mg de óleo-resina de copaíba

Houve diminuição significativa da MPO no GT400 no T24 comparado ao respectivo controle (GCV). Houve diminuição significativa da MPO no T48 ($1,92 \pm 0,27$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$) e no T168 ($1,72 \pm 0,26$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$), no GCV (Tabela 25, Figura 35).

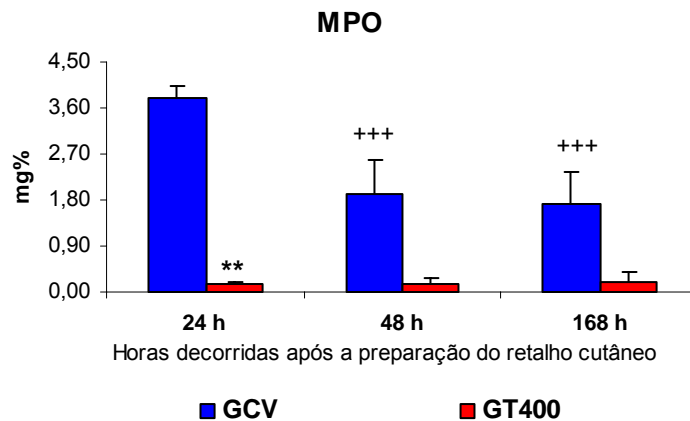
Tabela 25 – Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou 400 mg de óleo-resina de copaíba

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após a preparação do retalho cutâneo					
		T24		T48		T168	
Solução salina + Isquemia/Reperusão Tween 80 + Óleo- Resina 400 mg + Isquemia/Reperusão	GCV	3,80	$\pm 0,25$	1,92	$\pm 0,66$ +++	1,72	$\pm 0,64$ +++
	GT400	0,15	$\pm 0,03$ **	0,16	$\pm 0,13$	0,20	$\pm 0,20$

Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo GCV

+++ $p < 0,001$ comparado ao T24 no GCV



Testes: Kruskal-Wallis / Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm D.P)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo GCV

+++ $p < 0,001$ comparado ao T24 no GCV

Figura 35 - Concentrações de MPO (mg%) no tecido, comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e GrupoTeste2 (GT400), pré-tratados com solução salina ou Tween 80 (veículo) e submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico

5 DISCUSSÃO

O rato foi o animal de experimentação escolhido para esse estudo. É um mamífero de baixo custo, apresenta elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico (FESTING, 1979) e, já foi utilizado por grande número de pesquisadores, no estudo dos efeitos da isquemia-reperusão em retalhos cutâneos randomizados do dorso (Quadro 2, Anexo B). Optou-se por utilizar animais em um intervalo de peso entre 150g e 300g, cuja normalidade da distribuição desse peso no experimento foi comprovada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Apêndice B).

A técnica anestésica utilizada consistiu na associação do cloridrato de ketamina (90mg/kg de peso corporal) com xilazina (10mg/kg de peso corporal), administrados por via intraperitoneal, técnica utilizada por alguns autores (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002; SARIFAKIOGLU *et al.*; 2004; AYDOGAN *et al.*, 2006; MEIRER *et al.*, 2007). O cloridrato de ketamina (ketalar) cuja dose varia entre 15 a 100mg/kg, dependendo da via de administração e da associação deste com outros anestésicos, produz um tipo de anestesia dissociativa entre o córtex e o tálamo. Causa analgesia, sem perda total dos reflexos protetores. (SCHANAIDER; SILVA, 2004). A xilazina (Rompum) é utilizada na dose de 3 a 10mg. A combinação ketamina e xilazina por via intramuscular ou intraperitoneal, mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso se prolongue o tempo cirúrgico. (SCHANAIDER; SILVA, 2004).

Nesse estudo foi utilizado, como modelo experimental, o retalho cutâneo randomizado do dorso do rato, medindo 8cm de comprimento por 2,5cm de largura, com base distal. Encontram-se, na literatura científica, retalhos de dorso e da face ventral de ratos, com dimensões variadas. O modelo utilizado nesse experimento foi baseado no retalho idealizado por McFarlane (1965), onde consistia em retalho retangular de dorso de rato, medindo 10cm por 4cm, com base cranial e modificado por Sarifakioglu *et al.* (2004), medindo 8cm de comprimento por 2,5cm de largura, de base caudal. Na região distal dos retalhos cutâneos randomizados, o fluxo sanguíneo diminui inicialmente, para aumentar significativamente após as 24 horas que se seguem à sua elevação. Essa região (distal) constitui um estado de isquemia incompleta, com lesão tecidual (AYDOGAN *et al.*, 2006). No rato, a camada muscular ou *panniculus carnosus* é aderida à cútis e frouxamente à fascia profunda, enquanto que, no ser humano, a gordura superficial ou *panniculus adiposus* é mais

firmemente aderida à fáscia profunda. Quanto à irrigação cutânea, essas camadas são comparáveis, pela grande quantidade de vasos presentes (FREIRE *et al.*, 2003; CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). Entretanto, a elevação do retalho de pele ocasiona um estado hiperadrenérgico, inicialmente; após a secção dos nervos simpáticos, por acúmulo de noradrenalina. A vasoconstrição resultante induz à oclusão capilar temporária, porém, completa. Essas condições são compatíveis, com a já bem descrita, síndrome de isquemia e reperfusão, onde são gerados radicais livres (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). No entanto, ao longo de um retalho isquêmico existe uma área em que a sobrevida cutânea é esperada (porção proximal), pois, o aporte de oxigênio é adequado ao metabolismo celular. Em outra (porção distal), a necrose é mais provável, pela incapacidade de manutenção metabólica necessária. Entre essas duas, há uma área denominada de “zona de transição”, submetida a um período de isquemia, seguida por gradual reperfusão, onde uma adequada manipulação farmacológica tentaria diminuir a possibilidade de necrose (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). Nesse estudo, essa zona de transição no retalho cutâneo do animal, foi a área utilizada para coleta e dosagem laboratorial do TBARS, glutaciona e mieloperoxidase.

Todavia, a partir do terceiro dia de pós-operatório são identificados sinais de neovascularização no retalho cutâneo, desde o leito receptor e da área cutânea vizinha, onde o pedículo secundário estará completo em torno de nove dias (ALMEIDA *et al.*, 2004). Nesse estudo, o período de observação final dos retalhos cutâneos randomizados foi estabelecido no 7º. dia de pós-operatório, tendo em vista que, nessa data, já está bem definida a eventual área de necrose, além do processo de angiogênese e formação de neovascularização, a partir do leito receptor e da área perimetral já estarem instaladas (ALMEIDA *et al.*, 2004). O acompanhamento diário dos animais não evidenciou qualquer comprometimento da ferida operatória.

Paiva *et al.* (1998) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, em doses de 100, 200 e 400mg/kg de peso corporal, em ratos, comparando com a cimetidina, em lesões gástricas ocasionadas por etanol, indometacina e estresse. O óleo-resina de copaíba foi utilizado sob forma de suspensão aquosa, tendo como veículo de suspensão o Tween 80, a 2%, em água destilada. Essas doses foram baseadas em um estudo experimental preliminar, sendo administradas por via oral ou intraduodenal, em um volume de 10ml/kg, onde o grupo controle recebeu o mesmo volume de Tween 80. Nesse estudo foi observada uma redução da área

lesada (em mm²) com o uso do óleo-resina de copaíba, em relação à cimetidina, para os casos induzidos por etanol, como seguem: (copaíba 100 – 6,49 ± 0,95; copaíba 200 – 4,78 ± 1,51; copaíba 400 – 0,57 ± 0,37; cimetidina 100 – 12,12 ± 4,55). Para os casos induzidos por indometacina (copaíba 100 – 19,67 ± 1,65; copaíba 200 – 10,50 ± 2,77; copaíba 400 – 5,00 ± 0,77; cimetidina 100 – 23,83 ± 1,56/scores da úlcera); Para os casos de úlcera por estresse (copaíba 100 – 20,00 ± 3,78; copaíba 200 – 6,00 ± 1,22; copaíba 400 – 3,40 ± 2,23; cimetidina 100 – 2,80 ± 2,13/ scores da úlcera). Assim, os autores concluíram que o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* é um agente gastroprotetor efetivo.

O fracasso na perfusão microvascular seguindo o processo de isquemia-reperfusão parece estar associado à infiltração de células inflamatórias, exacerbado pela interação dos leucócitos com as células do endotélio e, liberação de mediadores inflamatórios. Os neutrófilos ativados, aderidos ao endotélio microvascular, podem secretar a enzima mieloperoxidase e favorecer a formação de espécies reativas de oxigênio, com subsequente lesão tecidual. Uma vez que, o radical do oxigênio iniciou a peroxidação lipídica e a lesão protéica, isso pode explicar a função celular prejudicada; bem como, a necrose associada à reperfusão. Foi demonstrado que, durante a reperfusão, o oxigênio molecular reage com a xantina oxidase e hipoxantina, produzindo radicais livres de oxigênio (PAIVA *et al.*, 2004).

Paiva *et al.* (2004) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, em concentrações de 200 e 400mg/kg de peso corporal, tendo como veículo de suspensão o Tween 80, a 2%, em água destilada, em ratos Wistar, machos, pesando entre 180 a 200g, administrados por via oral (15 e 2 horas antes) e via retal (2 horas antes), em colite induzida por ácido acético, em um volume de 01ml. Observaram os seguintes resultados por score da lesão: grupo controle (8,67 ± 0,33), via retal(copaíba 200 – 3,60 ± 0,24; copaíba 400 – 2,50 ± 0,57), via oral(copaíba 200 – 5,80 ± 0,49; copaíba 400 – 5,40 ± 0,24). Observaram, ainda que, nessas concentrações, o óleo-resina de copaíba reduzia os níveis de mieloperoxidase e malonaldeído nos tecidos da colite induzida por ácido acético. Tendo em vista que, a mieloperoxidase, uma enzima heme, abundante e liberada de grânulos oriundos da ativação de neutrófilos pelo estímulo inflamatório que, catalisa a formação de um número de espécies reativas, é um marcador bioquímico da infiltração dos neutrófilos nos tecidos lesados. A redução da atividade dessa enzima

pode ser interpretada como uma manifestação de ação anti-inflamatória, de um composto administrado. Entretanto, sendo o malonaldeído um indicador da peroxidação lipídica, os autores acima concluíram que, nessas concentrações, o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* apresenta ações anti-inflamatória, anti-oxidante e anti-lipoperoxidativa em seu experimento.

O óleo-resina de copaíba, em relativas altas doses, > 1,6g/kg de peso corporal, pode causar diarreia. Porém, em administração, por via oral, em ratos, acima de 5g/kg de peso corporal, não ocasionou a morte dos mesmos (PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b). Assim, a opção da utilização dessas concentrações do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* nesse experimento, é baseada nesses trabalhos de Paiva *et al.* (2004a, 2004b).

Resumindo, o delineamento experimental levou em consideração os seguintes fatores:

O retalho cutâneo randomizado do dorso de rato foi baseado na publicação de McFarlane (1965) e modificado por Sarifakioglu *et al.* (2004), sendo um retalho retangular, de base caudal e medindo 8 X 2,5cm.

O tempo compreendendo a isquemia e reperfusão, assim como, o período de estabilização da necrose foi de 7 dias pós-operatório, baseado no trabalho de Sarifakioglu *et al.* (2004).

A utilização do Tween 80 como diluente do óleo-resina da copaíba, assim como, as doses desse diluente, bem como, as doses da copaíba utilizadas nesse experimento foram baseados nos trabalhos de Paiva *et al.* (1998, 2004a, 2004b).

Para validar o modelo de isquemia-reperfusão no presente estudo, foi realizada uma análise estatística, comparando-se o grupo controle salina com os demais grupos e dosados as concentrações de malonaldeído, glutathione e mieloperoxidase nos tecidos e malonaldeído e glutathione no sangue.

Para afastar a possibilidade de que o diluente empregado nesse estudo pudesse interferir no que diz respeito a potencializar o efeito do óleo-resina da copaíba, o mesmo foi utilizado em um grupo individualizado (GCV).

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular (C₃H₄O₂, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um

ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944, é bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)”, representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA:TBA (1:2), $C_{11}H_8N_4S_2O_4 \cdot H_2O$ (P.M.=342,35), que tem absorção máxima em 532 nm e apresenta fluorescência ($\lambda_{exc} = 515$ nm e $\lambda_{em} = 553$ nm). A avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois muitas outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA (LIMA; ABDALLA, 2001).

Nesse estudo não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de TBARS comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 1, Figura 11), sugerindo que o Tween 80 não apresenta ação protetora no que diz respeito à peroxidação lipídica. Quando se comparam os grupos tratados com solução salina e 200mg de óleo-resina de copaíba, também, não se observam diferenças significantes no plasma. Isso sugere que, nessa concentração, a copaíba não manifestou efeito protetor quanto à lipoperoxidação (Tabela 2, Figura 12). No entanto, houve aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TBARS no GT400 no tempo T168, comparado ao respectivo controle (GCS) (Tabela 3, Figura 13). Isso faz sugerir uma possível ação pró-oxidante da copaíba, quando se aumenta a concentração e em um tempo posterior.

Todavia, não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de TBARS comparando-se os grupos Controle Veículo (GCV) e Teste1 (GT200) (Tabela 4, Figura 14). Essa comparação contribui com a observação que, nessa concentração, o óleo-resina de copaíba não atuou como anti-lipoperoxidativo. Por outro lado, ao se comparar o grupo controle veículo com o grupo teste 400, observa-se aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TBARS no GT400 nos tempos T24 e T168, corroborando com a idéia que, aumentando a concentração do óleo-resina de copaíba, o mesmo funciona como pró-oxidante, aumentando a peroxidação lipídica (Tabela 5, Figura 15).

No entanto, não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de TBARS comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 11, Figura 21), fato semelhante ocorrido no plasma, corroborando com a idéia de que o Tween 80 não age como anti-lipoperoxidativo e conseqüentemente, não comprometendo a avaliação do óleo-resina de copaíba, nesse estudo. Porém, houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS, no T24 comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste1 (GT200) (Tabela 12, Figura 22), evidenciando que, no tecido, o óleo-resina de copaíba agiu como anti-oxidante, diminuindo a peroxidação lipídica, em fase inicial do experimento, o que não ocorreu no plasma. De forma semelhante, Houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS , no T24 comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Teste2 (GT400) (Tabela 13, Figura 23). Observa-se, portanto que, aumentado a dose, o óleo-resina de copaíba manteve a ação anti-oxidante no tecido, na fase inicial do experimento.

Ainda assim, ao se comparar o Tween 80 com o óleo-resina de copaíba na concentração de 200mg, houve diminuição significativa nas concentrações teciduais de TBARS, no T24 (Tabela 14, Figura 24), fato semelhante quando comparado à solução salina, reforçando a idéia de que no tecido, a copaíba age de forma protetora diante da peroxidação lipídica, exibindo ação anti-oxidante. Porém, quando se compara o grupo controle veículo com o óleo-resina de copaíba em concentração de 400mg, observa-se aumento do TBARS no tecido, no T168 (Tabela 15, Figura 25). Isso faz crer que, o efeito anti-oxidante da copaíba, no tecido, não se mantém nas 168 horas, sendo semelhante ao encontrado no plasma.

Aydogan *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do ácido caféico em retalhos cutâneos de rato, medindo 10 X 3cm, de base caudal, onde os 18 ratos foram distribuídos em três grupos: o grupo controle, o grupo etanol (solvente para o ácido caféico) e o grupo com ácido caféico (CAPE). Os autores encontraram os seguintes resultados: MDA (nmol/g tissue) (Controle: 70.91±0.88 – Etanol:72.41±1.24 – CAPE:56.07±1.24), evidenciando, assim, um efeito anti-oxidante do ácido caféico.

Abla *et al.* (2005) utilizaram 28 ratos machos adultos Wistar-EPM distribuídos, ao acaso, em dois grupos de 14 animais, utilizando retalho cutâneo, medindo 10 X 4cm. Os ratos do grupo controle (CG) receberam água destilada e os animais do grupo Acetilcisteína (NACG) receberam NAC (300 mg/kg) por infusão oral, 15 minutos antes da elevação do retalho. No sétimo dia de pós-operatório, a

porcentagem de necrose distal foi determinada e amostras de pele colhidas para permitir a determinação dos níveis de MDA. Os autores encontraram os seguintes resultados: concentrações de MDA (ng/ml) da área de pele normal do retalho cutâneo de rato no 7º. dia de pós-operatório: Grupo Controle (Média: 2038 ; Grupo com Acetilcisteína: 935) e concentrações de MDA (ng/ml) da área de transição entre pele normal e área de necrose do retalho cutâneo de rato no 7º. dia de pós-operatório: Grupo Controle (Média: 1235 ; Grupo com Acetilcisteína: 2346. Os autores justificam que, altos níveis de malonaldeído não necessariamente levam à morte celular, porém, são provenientes de restos íntegros de tióis protéicos. Esses resultados mantêm certa relação com o presente estudo, tendo em vista que, houve aumento do MDA na área de transição entre a pele normal e a área de necrose, correspondendo à área utilizada para análise laboratorial do estudo em questão.

De Freitas *et al.* (2002) utilizaram 8 ratos Wistar, com peso entre 300 - 400g, sendo confeccionados 2 retalhos epigástricos por animal (controle e experimento), um deles submetido à 16h de isquemia (RI) seguida de 45 min de reperfusão (RR) e o outro controle (RC). Foram colhidas 3 biópsias de pele dos retalhos (RC, RI, RR) e encaminhadas para dosagem de MDA e XO. As medianas das concentrações tissulares de malonildialdeído- MDA em retalhos cutâneos controles (RC), isquêmicos (RI) e reperfundidos (RR) de 8 ratos estudados foram conforme resultados a seguir: retalho controle = 34,50 (16,0 – 73,0); retalho isquêmico - 54,35 (21,8 – 90,0); retalho reperfundido = 84,25 (47,8 – 115,0). A análise bioquímica mostrou aumento significativo dos níveis teciduais de MDA após a reperfusão em relação aos retalhos controles. Os autores concluíram que: o aumento de MDA, após a reperfusão nos retalhos reperfundidos, sugere que a lipoperoxidação de membranas foi mais intensa ao final deste período e houve tendência ao aumento da lipoperoxidação após a isquemia e que os retalhos epigástricos de ratos submetidos à 16h de isquemia e 45min de reperfusão apresentam elevação dos níveis teciduais de MDA caracterizando a lipoperoxidação da membrana celular.

A glutatona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. A resistência de muitas células contra o estresse oxidativo está associada com elevados níveis intracelulares de glutatona em sua forma reduzida. O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado

redox da glutathione aumentando a liberação de glutathione oxidada (dissulfeto) no organismo. Assim, alguns estudos têm direcionado o interesse no monitoramento de glutathione em amostras biológicas com o propósito de se estudar a patologia de algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Atualmente existem diferentes métodos analíticos utilizados na determinação de glutathione procurando correlacionar os níveis desse importante tripeptídeo e enzimas que fazem parte deste ciclo metabólico com o sistema antioxidante. Na avaliação do estresse oxidativo pode-se estudar as variações das concentrações das principais enzimas e substratos do ciclo catalítico da glutathione, porém esta não é uma tarefa simples, devido ao fato de haver muitas interações químicas entre estas espécies. Um dos papéis do ciclo redox da glutathione e enzimas que compõe seu metabolismo é o de manter os níveis de hidroperóxidos lipídicos a níveis controlados, para evitar danos celulares provenientes do ataque desses radicais (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

A glutathione reduzida é o tiol de baixo peso molecular mais abundante presente, em virtualmente, todos os sistemas celulares dos mamíferos. A versatilidade de suas propriedades químicas faz com que ela sirva como um redutor eficiente, através da interação com numerosos componentes oxidantes como $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\bullet\text{OH}$. (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). O núcleo do resíduo cisteilglicina da glutathione está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical $\text{GS}\bullet$, que produz, por dimerização, o GSSG (glutathione oxidada). O GSSG é, então, reduzido pela glutathione redutase, regenerando o GSH, num processo à custa de NADPH. A glutathione redutase, que regenera o GSH tem o NADPH como substrato. O fígado sintetiza o GSH, mas o GSH ingerido pode ser absorvido intacto, no intestino delgado, sendo transportado, aumentando o GSH plasmático. O processo pelo qual a glutathione detoxifica hidroperóxidos é o seguinte:



Entre as funções do GSH, na proteção contra a peroxidação lipídica, podem ocorrer três reações. Primeiro, o GSH é usado como substrato pela glutathione peroxidase, na eliminação de peróxidos. Segundo, o GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Finalmente, o GSH pode, através da glutathione-S-transferase, detoxificar

aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica. (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998).

No presente estudo houve aumento significativo das concentrações plasmáticas de GSH no GCV, comparado ao GCS, nos tempos T24 e T48 (Tabela 6, Figura 16). Esse fato pode refletir uma possível ação discreta do Tween 80 como anti-oxidante, durante a isquemia e reperfusão dos retalhos cutâneos do experimento, sem prejudicar o estudo. Entretanto, quando o óleo-resina de copaíba, na concentração de 200mg, é comparado ao controle salino, observa-se aumento significativo da glutathiona plasmática no tempo T48, efeito que não se mantém no T168 (Tabela 7, Figura 17). Ainda assim, quando o óleo-resina de copaíba, na concentração de 400mg, é comparado ao controle salino, observa-se aumento significativo da glutathiona plasmática nos tempos T24 e T48 (Tabela 8, Figura 18), evidenciando efeito anti-oxidante da substância estudada.

No entanto, quando o óleo-resina de copaíba, na concentração de 200mg, é comparado ao controle veículo, há um aumento significativo da concentração de GSH no plasma, em todos os tempos estudados (Tabela 9, Figura 19), onde o grande aumento pode ser devido à associação dos efeitos anti-oxidantes da copaíba com os do Tween 80. Ainda assim, quando o óleo-resina de copaíba, na concentração de 400mg, é comparado ao controle veículo, há um aumento significativo da concentração de GSH no plasma, em todos os tempos estudados (Tabela 10, Figura 20), evidenciando, também, nessa concentração, a atividade anti-oxidante da copaíba.

Todavia, não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de GSH comparando-se os grupos Controle Salino (GCS) e Controle Veículo (GCV) (Tabela 16, Figura 26). Nesse caso, não se observa nos tecidos atividade anti-oxidante do Tween 80, como demonstrada no plasma. No entanto, quando comparado o óleo-resina de copaíba, na concentração de 200mg, com o controle salino, não se observa aumento significativo nas concentrações de glutathiona nos tecidos, efeito inverso ao encontrado no plasma, não demonstrando aqui atividade anti-oxidante (Tabela 17, Figura 27). Porém, quando comparado o óleo-resina de copaíba, na concentração de 400mg, com o controle salino, observa-se aumento significativo das concentrações de glutathiona nos tecidos, em todos os tempos estudados, fazendo crer que, no tecido, a atividade anti-oxidante está relacionada com a dose administrada (Tabela 18, Figura 28).

Não obstante, quando comparado o óleo-resina de copaíba, na concentração de 200mg, com o controle veículo, não foi observado aumento significativo das concentrações teciduais de glutathiona (Tabela 19, Figura 29). Porém, quando comparado o óleo-resina de copaíba, na concentração de 400mg, com o controle veículo, houve aumento significativo nas concentrações teciduais de GSH no tempo T24, corroborando com a idéia de que no tecido, a atividade anti-oxidante da copaíba está relacionada com a dose administrada (Tabela 20, Figura 30).

Aydogan *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do ácido caféico em retalhos cutâneos de rato, medindo 10 X 3cm, de base caudal, onde os 18 ratos foram distribuídos em três grupos: o grupo controle, o grupo etanol (solvente para o ácido caféico) e o grupo com ácido caféico (cape). Os autores encontraram os seguintes resultados para a glutathiona nos tecidos: GSH(nmol/g tissue) Controle: 1.69 ± 0.18 – Etanol: 1.49 ± 0.14 – CAPE: 5.24 ± 0.22). Observa-se que esses resultados mantêm uma relação com o presente estudo, no que diz respeito ao aumento dos níveis teciduais de GSH.

A mieloperoxidase é uma enzima hemática, específica dos grânulos azurófilos. É a única da sua espécie que tem duas atividades, sendo a de peroxidase e outra de cloração. Durante a reação com o H₂O₂, a mieloperoxidase férrica é oxidada ao composto I, caracterizado por um estado radicalar. Quando a mesma atua como uma peroxidase, o composto I é reduzido de volta à forma de mieloperoxidase férrica, através de duas oxidações monoelétrônicas, com a doação de um elétron, para a formação de um estado intermediário não radicalar da enzima (composto II). Os doadores de elétrons, geralmente, a tirosina, ascorbato, urato, etc..., são oxidados em radicais intermediários, os quais podem-se difundir e gerar novas espécies ativas. O nitrito está envolvido no ciclo de peroxidação da atividade da mieloperoxidase, com a liberação de espécies reativas de nitrogênio, podendo lesar as proteínas e constituintes celulares. Por outro lado, além da atividade de peroxidação, a única característica da mieloperoxidase consiste em sua capacidade em oxidar íons, principalmente ânions clorídricos. O íon clorídrico é transformado, passo-a-passo, através de oxidações dieletrônicas em um oxidante potente, o ácido hipocloroso (ClOH), o qual tem um importante papel como antimicrobiano e, participa de ambas as reações de oxidação e cloração. Devido a sua importante atividade enzimática, a mieloperoxidase é mais e mais considerada como um marcador da

ativação e degranulação dos neutrófilos de um grande número de afecções. Em inflamação aguda e crônica, quando os neutrófilos são estimulados por vários mediadores ou durante a fagocitose, eles produzem espécies reativas de oxigênio e liberam a mieloperoxidase, exercendo uma atividade oxidante em células e tecidos vizinhos (THIERRY *et al.*, 2007).

Entretanto, nesse estudo, houve aumento significativo das concentrações teciduais de MPO nos tempos T24 e T48 no GCV, comparado ao GCS (Tabela 21, Figura 31), sugerindo uma atividade pro-inflamatória do Tween 80 nesse experimento. Quanto ao grupo controle salina, a atividade inflamatória aumenta no tempo T168, com maior elevação da concentração de mieloperoxidase (Tabela 21, Figura 31).

Quando se compara o óleo-resina de copaíba, em concentrações de 200mg, com o grupo controle salina, observa-se uma diminuição significativa das concentrações de mieloperoxidase nos tecidos, no tempo T168, evidenciando atividade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba (Tabela 22, Figura 32).

.Resultado semelhante é observado, quando se compara o óleo-resina de copaíba em concentração de 400mg, com o grupo controle salina; onde a diminuição significativa das concentrações teciduais de mieloperoxidase acontece, também, no tempo T168, evidenciando ação anti-inflamatória tardia, não dependendo das doses que foram empregadas nesse experimento (Tabela 23, Figura 33).

Todavia, quando se compara o óleo-resina de copaíba em concentração de 200mg, com o grupo controle veículo, observa-se uma diminuição significativa das concentrações teciduais de mieloperoxidase no tempo T24, evidenciando uma ação anti-inflamatória na fase inicial (Tabela 24, Figura 34). Entretanto, houve diminuição significativa da MPO no T48 ($1,92 \pm 0,27$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$) e no T168 ($1,72 \pm 0,26$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$), no GCV (Tabela 24, Figura 34), sugerindo que o processo inflamatório pode ocorrer ao longo do tempo do estudo.

Não obstante, quando se compara o óleo-resina de copaíba em concentração de 400mg, com o grupo controle veículo, observa-se uma diminuição significativa das concentrações teciduais de mieloperoxidase no tempo T24 (Tabela 25, Figura 35), evidenciando-se ação anti-inflamatória na fase inicial do experimento, não dependendo das doses empregadas nesse estudo. Ainda assim, Houve diminuição significativa da MPO no T48 ($1,92 \pm 0,27$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$) e no T168 ($1,72 \pm 0,26$) comparado ao T24 ($3,80 \pm 0,10$), no GCV (Tabela 25, Figura 35),

também, sugerindo atividade inflamatória durante o longo do tempo empregado no estudo. Nesse caso, é observado que o efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba se mantém, quando se aumenta a dose do mesmo.

Paiva *et al.* (2004b) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, em concentrações de 200 e 400mg/kg de peso corporal, tendo como veículo de suspensão o Tween 80, a 2%, em água destilada, em ratos Wistar, machos, pesando entre 180 a 240g, administrados por via oral (24,12 e 2 horas antes), em isquemia-reperfusão intestinal, onde foram dosados, dentre outros, a mieloperoxidase e malonaldeído, tendo sido obtidos os seguintes resultados nos tecidos: para mieloperoxidase (grupo sham - $0,068 \pm 0,012$; grupo veículo - $0,297 \pm 0,029$; copaíba 200 - $0,256 \pm 0,026$; copaíba 400 - $0,221 \pm 0,017$); para o malonaldeído (grupo sham - $0,082 \pm 0,010$; grupo veículo - $0,212 \pm 0,089$; copaíba 200 - $0,260 \pm 0,006$; copaíba 400 - $0,050 \pm 0,009$). Foi, então, concluído que o óleo-resina de copaíba reduziu a mieloperoxidase, evidenciando ação anti-inflamatória, já mostrada no experimento com a colite induzida por ácido acético e, reduziu, também, os níveis de malonaldeído, exibindo ação anti-lipoperoxidativa; bem como, aumentou os níveis de glutathione nos tecidos, mostrando ação anti-oxidante. Assim, o trabalho de Paiva *et al.* (2004b) mantém uma relação de resultados semelhantes com o presente estudo, embora os modelos experimentais sejam diferentes.

Finalmente, pode ser afirmado que, a lesão causada pela isquemia-reperfusão é complexa, havendo necessidade da utilização de substâncias capazes de aumentar a resistência dos tecidos a esse fenômeno, diminuindo a produção e neutralizando a ação dos radicais livres. As substâncias utilizadas no presente experimento necessitam de estudos adicionais, com o intuito de definir sua aplicação em seres humanos e, com isso, diminuir a necrose dos retalhos cutâneos, efeito sobremaneira almejado pela cirurgia plástica.

6 CONCLUSÃO

O óleo-resina de copaíba apresenta discreta ação anti-lipoperoxidativa, porém, intensa ação anti-oxidante e atividade anti-inflamatória, durante a isquemia e reperfusão de retalho cutâneo randomizado.

REFERÊNCIAS

- ABLA, L. E. F.; GOMES, H. C.; PERCARIO, S.; FERREIRA, L. M. Acetilcisteína em retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 2, p.121-123, 2005.
- ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; D'ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevivência de retalhos cutâneos em ratas. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.17, supl.1, p.14-16, 2002.
- ALMEIDA, K. G. de; FAGUNDES, D. J.; MANNA, M. C. B.; SOUZA, E. F. de Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.19,n. 6, p. 649-657, 2004
- ALVES, M. A.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P. R. C. de; VASCONCELOS, P. R. L. de. Efeitos da L-alanil-glutamina sobre os parâmetros bioquímicos do sangue e do rim no rato submetido à isquemia/reperfusão do membro pélvico. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 445-449, 2005.
- ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C. de; VASCONCELOS, P. R. L. de. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 209-215, 2003.
- ANDRADE JÚNIOR, D. A. de; SOUZA, R. B. de; SANTOS, S. A. dos. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ANDREIA, C. M.; SILVA, B.A.; ORTIZ, V.; SILVA, R. A. da; TOGNINI, J. R. Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, 2005.
- ARAÚJO JÚNIOR, F. A.; BRAZ, M. N. ROCHA NETO, O.G. DA; COSTA, F. D'ALMEIDA; 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 Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 2005.
- ATABEY, A.; GALDINO,G.; EL-SHAHAT, A.; RAMIREZ, O. M. The effects of tumescent solutions containing lidocaine and epinephrine on skin flap survival in rats. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n. 1, p. 70-72, July 2004
- AYDOGAN, H.; GURLEK, A.; PARLAKPINAR, H.; ASKAR, I.; BAY-KARABULUT, A.; AYDOGAN, N.; FARIZ, A.; ACET, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 60, n.5, p. 563-568, 2007.

BANKS, H. Structure of pollen apertures in the detarieaceae *sensu stricto* (*Leguminosae caesalpinioideae*), with particular reference to underlying Structure (Zwischenkorper). **Ann. Botany**, v. 92, p. 425-435, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, n. 1, p. 101-109, Jan. 1988.

BEHESHTIAN, A.; DEMEHRI, S.; KIUMEHR, S. ATP-sensitive Potassium channels mediate the anti-ischemic properties of ischemic and pharmacologic preconditioning in rat random-pattern skin flap. **Ann. Plast. Surg.**, v. 57, n. 1, July 2006.

BIONDO-SIMÕES, M. de L. P.; GRECA, F. H.; PAULA, J. B. de *et al.* Influência do Buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos - estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, supl. 3, p. , 2000.

BIONDO-SIMÕES, M. de L. P.; GRECA, F. H.; IOSHI, S. *et al.* Influência do antibiótico nas lesões de isquemia e reperfusão intestinal estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, supl. 3, p., 2000.

BITTENCOURT, R. C.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; PAULA, J. B. de; CHIN, E.; SANTOS, E.A.A.DOS; STALHSCHMIDT, F.L.. Influência do minoxidil sobre retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 36-40, 2005.

BRITO, M. V. H.; ARAÚJO, M. de; ACÁCIO, G. J. S. REIS, J.M.C.DOS. Lesão intestinal após isquemia-reperfusão: estudo comparativo usando sal tetrazólico (mtt) e histologia. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 1, jan./mar. 2001.

BRITO, M. V. H.; OLIVEIRA, R. V. B. de; SILVEIRA, E. L. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, n. 2, abr./jun. 2000.

BRITO, M. V. R.; MOREIRA, R. de J.; TAVARES, M. L. C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A. DE A.S.DOS. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 243 - 246 , 2005.

BRITO, N. M. B.; KULAY-JÚNIOR, L.; SIMÕES, M. de J. Estudo ultraestrutural do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, n. 4, out./dez.. 2000.

BRITO, N. M. B.; KULAY-JÚNIOR, L.; SIMÕES, M. de J. LAMEIRA, O.A; LAMARÃO, L.G.; DAMOUS, S.H.B. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **RBGO**, v. 22, n. 8, p. 489 , 2000.

BUSSOLATI, B.; AHMED, A.; PEMBERTON, H. LANDIS, R.C.; DICARLO, F.; HASKARD, D.O.; MASON, J.C. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 761-766 , Feb. 2004.

CAMPOS, H.; FERREIRA, L. M.; SANTOS, W. L. C. dos; ARAÚJO, M. C. M. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 16, n. 4, out./dez. 2001.

CARVALHO, E. N. de; FERREIRA, L. M.; CARVALHO, N. A. S. de; ABLA, L. E. F.; LIEBANO, R. E. Viabilidade do retalho cutâneo randômico dorsal em ratos diabéticos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 225-228 , 2005.

CARVALHO, D.; FERREIRA, R. A; OLIVEIRA, L. M. de OLIVEIRA, A.F.DE; GEMAQUE, R.C.R.. Eletroforese de Proteínas e isoenzimas em semenetes de *Copaifera langsdorfii* desf. (*Leguminosae caesalpinioideae*) envelhecidas artificialmente. **Rev. Árvore**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 19-24, jan./fev. ano

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.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C.. Toxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 6, p. 417-423 , 2002.

CESAR, G. **Curiosidades da nossa flora**. Recife: Imprensa Oficial, 1956.

COSKUNFIRAT, O. K.; OZKAN, O.; DIKICI, M. B. The effect of ischemic preconditioning on secondary ischemia in skin flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 57, n. 4, p. 431-434, Oct. 2006.

CYMROT, M.; PERCÁRIO, S.; FERREIRA, L. M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 18-26 , 2004.

DAVID FILHO, R.; MORAES, M. R. de S.; SILVA, J. C. C. B. GABRIEL JUNIOR, A.; ULIAN, M.; MIRANDA JUNIOR, F.;BURIHAN, E. Bloqueio das moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na prevenção da lesão de reperfusão na musculatura esquelética de ratos Wistar EPM–1. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, p. 590-596 , 2004.

DEL CASTILHO, M. I. C. **Bras. PI BR 93 01/950**, 1993.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, Jan. 2002.

DUCKE, A. **As leguminosas da Amazônia Brasileira**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1939.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. das G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Med. Patol. Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-360, 2003.

DWYER, J. D. **Brittonia**, v. 7, p. 143, 1951.

ERSOY, A.; SEVIN, K.; SEVIN, A.; SEREL, S. Effects of clopidogrel on survival of rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. , n. , p. 1-3, 2007.

ESTEVEZ JUNIOR, I.; FERREIRAL, M.; LIEBANO, R. E. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, p. 626-629, 2004.

ESTEVEZ JUNIOR, I.; MASSON, I. B.; FERREIRA, L. M. LIEBANO, R.E.; BALDAN, C.; GOMES, A.C. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 164-167, 2005.

FELICITY, N. E.; GAVINS, S. Y.; AHMAD, M. K.; RODERICK, J.F.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin :ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-4147, May 2003.

FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory of *Copaíba* balsam (*Copaifera cearenses*, Huber). **Rev. Bras. Farm.**, v. 73, p. 53, 1992

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, supl. 2, p. 28-34, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigations. In: ALTMAN P. I.; KATS, D. D. (Ed.). **Inbred and genetically defined strains of laboratory animal, mouse and rat**. Bethesda: Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1979. v. 1, p. 237-238,

FLEURY, M. **Acta Bot. Gallica**, v. 144, p. 473, 1997.

FONSECA, A. V.; FERREIRA, L. M.; GOMES, H. C.; PERCARIO, S. Terazosin and propranolol as blockers to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 3, May/June 2004.

FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J. C. C. B.; FAGUNDES, D. J.; PERCÁRIO, S. NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 134-139 , 2005.

FRANCISCHETTI, I.; MAFFEI, F. H. de A.; BITU-MORENO, J. FUHRMANN NETO, M.; COELHO, M.P.V.; TSUKAI, F.H.; SEQUEIRA, J.L.; YOSHIDA, W.B. Ação do ácido trissódio-cálcio-dietilenotriaminopentaacético (cana3dtpa) nas lesões de isquemia-reperfusão em membro posterior de rato. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 5, p. 332-341 , 2002.

FREIRE, S. T.; FERREIRA, L. M.; GOMES, H. C.; PERCARIO, S. Uric acid as a monitor of oxidative stress in a random skin flap in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 6, p. 534-536 , 2003.

FREITAS, F.A.S. de; PICCINATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CHERRI, J. Estudo da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, supl. 3, p. 74-78 , 2002.

FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, caesalpinioideae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 3, p. 311-321, set. 2002.

GILBERT, B.; MORS, W. B.; BAKER, P. M. TOMASSINI, T. C.; PELLEGRINO, J. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 44, p. 423, 1972.

GOMES, H. C.; CAMPOS, J. H. O.; FERREIRA, L. M.; KOBAYASHI, L. A.; Experimental model to study the effect of nicotine in a random skin flap in the Rat. **Acta Cir. Bras.**, v.19, 2004. special ed.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P. MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 486-492, 2007.

GraphPad InStat® versão 3.00 para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em:< <http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GraphPad Prism® versão 4.00 para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em:< <http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GraphPad Software para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em: < <http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, p. 130-132, Mar./Apr. 2005.

GHAVAMI, A.; NUTT, M. P.; HARDY, S. P. Heat shock protein and high-dose aspirin: effects on random skin flap survival in a rat model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 48, n. 1, p. 60-67, Jan. 2002.

GRIBBE, O.; SAMUELSON, U. E.; WIKLUND, N. P.; Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v., n., p. 287-293, 2007.

HAKAN, A.; ALI GURLEK, A.; HAKAN, P. ASKAR, I.; BAY-KARABULUT, A.; AYDOGAN, L.; FARIZ, A.; ACET, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v., n., p. 1-6, 2006.

HALFOUN, V. L. R. C.; FERNANDES, T. J.; PIRES, M. L. E. BRAUN, E.; CARDOZO, M.G.T.; BABBOUT, G.C. Estudos morfológicos e funcionais da microcirculação da pele no Diabetes *Mellitus*. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 3, p. 271-279, jun. 2003.

HAMAR, J.; RÁCZ, I.; ČÍ, M. .; LOJEK, A.; PALLINGER, E.; FUREZZ .Time course of leukocyte response and free radical release in an early reperfusion injury of the superior mesenteric artery. **Physiol. Res.**, v. 52, p. 417-423, 2003

HART, K.; BAUR, D.; HODAM, J.; LESOON-WOOD, L.; PARHAM, M.; KEITH, K.; VASQUEZ, R.; AGER, E.; PIZZARRO, J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. **Laryngoscope**, v. 116, n., p. 522-528, Apr. 2006.

HOSNUTER, M.; KARGI, E.; PEKSOY, I.; BABUCC, O.; PAYASLI, C. An ameliorated skin flap model in rats for experimental research. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 59, p. 299–303, 2006.

HUANG, S-. S.; WEI, F-. C.; HUNG, L-. M. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte – endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase. **C. Circ. J.**, v. 70, p. 1070–1075, 2006.

HUEMER, G. M.; WECHSELBERGER, G.; OTTO-SCHOELLER, A. GURUNLUOGH, R.; PIZA-KATZER, H.; SCHOELLER, T. Improved dorsal random-pattern skin flap survival in rats with a topically applied combination of Nonivamide and Nicoboxil. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 111, n. 3, p. 1207-1211 . Mar. 2003.

JAIMES, E. A.; SWEENEY, C.; RAIJ, L. Endothelial nitric oxide production effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. **Hypertension**, v. 38, p. 877-883, 2001.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, jul./set. 1998.

KHANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M JABER, H.; NAKATSU, T. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 2328, 1992.

KHALIL, A. A.; AZIZ, F. A.; HALL, J. C. Reperfusion Injury. **Reperfusion Injury**, v. 117, n. 3, p1024-1033, 2006.

KOMOROWSKA-TIMEK, E.; TIMEK, T. A.; BREVETTI, L. S. SZUBA, A.; STUELINGERM.; HARDESTY, R.A; BUNCKE, H.J. Oral administration of L-Arginine decreases necrosis of the epigastric skin flap in the rat. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n. 1, p. 73-78, July 2004.

LACEY, L.A.; SCHRECK, C. E.; MCGOVERN, T. P. **Mosquito News**, n. 41, p. 376, 1981.

LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. **Acta Bot. Bras.**, v. 7, p. 61,1993.

LIEBANO, R. E.; ABLA, L. E.; FERREIRA, L. M. Efeito da estimulação elétrica nervosa transcutânea em alta frequência na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 133-138, 2006.

LINEAWEAVER, W. C.; LEI, M-. P.; MUSTAIN, W. OSWALD, T.M.; CUI, D.; ZHANG, F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. **Ann. Surg.**, v. 239, n. 6, p. 866 - 875, June 2004.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ci. Farm.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez., 2001.

LORENZI H. **Árvores brasileiras**. 4. ed. [S.l.]: Instituto Plantarum de Estudos e Flora, 2002.

LYSIAK, J. J.; TURNER, S. D.; NGUYEN, Q. A.T. SINGBARTL,K.; LEY, K.; TURNER, T.T. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. **Biol. Reproduct.**, v. 65, p. 718–725, 2001.

MANFREDINI, V.; ROEHRS, R.; PERALBA, M. C. R. HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J.; RAMOS, A.I.I.P.; BENFATO, M.S. Glutathione peroxidase induction in superoxide dismutase mutants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 159-165, 2004.

MARCATI, C. R.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) de floresta e cerradão. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 311-320, set. 2001.

MASSCHELEIN-KLEINER, L. **Ancient biding media, varnishes and adhesives.** Rome: ICCROM, 1995.

MATTA, A. A. **Flora médica braziliense.** Manaus: Imprensa Oficial, 1913.

MAUAD JR, R.J.; SHIMIZU, M. H. M.; MAUAD, T. TOLOSA, E.M.C. Buflomedil and Pentoxifyline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with Nicotine. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 59, p. 387-392, 2006.

MATTOS-FILHO, A.; RIZZINI, C. T.; MAUTONE, L.; GUIMARÃES, E. F. **Árvores do jardim botânico.** Rio de Janeiro: Ed. Lidador, 1993.

MCDONALD, W.S.; P. JR, T.; THURMOND, M. JONES, C.; COHEN,R.; MILLER, A.; BEASLEY, D. Role of Nitric Oxide in Skin Flap Delay. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 113, nº 3, p. 927-931, Mar. 2004.

MEDEIROS, D. F.; XAVIER FILHO, L.; BARBOSA FILHO, J. M. **Bol. Soc. Brot. Ser. 2**, v. 58, p. 43, 1985.

MEIRER, R.; HUEMER, G. M.; OEHLBAUER, M. WANNER, S.; PIZA-KATZER; KAMILGER, F.S. Comparison of the effectiveness of gene therapy with vascular endothelial growth factor or shock wave therapy to reduce ischaemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 60, p. 266-271, 2007.

MENDONÇA, F.A.C. de; SILVA, K. F. S. da; SANTOS, K. K. dos. RIBEIRO JUNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629–636, 2005.

MORS, W.; RIZZINI, C.T. **Useful plants of Brazil.** San Francisco: Holden Day, 1966.

MURATA, A.; SEKYIA, K.; WATANABE, Y. YAMAGUCHI, F.; HATANO, N.; IZUMORI, K.; TOKUDA, M. A novel inhibitory of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 96, n. 1, p. 89-91, 2003.

NOGUCHI, A.; REIS, J. M. C. dos; DIAS, C. S. Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 2 mar./abr. 2002.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 3, p. 331-338, set. 2002.

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

OSHAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y.; BIOORG. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 4, p. 2889,1994.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SOUSA, E. T. de. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 51-56, 2004a.

PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 73–78, 1998.

PAIVA, L. A. F.; GURGELA, L. A.; CAMPOSA, A. R. SILVEIRA, E.R.; RAOA, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979–1987, 2004b.

PAIVA, L. A. F.; GURGELA, L. A.; SILVA, R. M. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vasc. Pharmacol.**, v. 39, p. 303– 307, 2003.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 2, p. 183-194, jun. 2002.

PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Liv. Kosmos, 1946.

PERROT, E. **Matières premières usuelles usuelles de rezime végétal**. Paris: Masson & Cia.,1943.

PICCINATO, C. E.; DOMENICO JR, A. de; JORDÃO JR, A. A.; VANNUCCHI, H. Isquemia e reperfusão do músculo esquelético aumenta a peroxidação lipídica em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 5, 2004.

PINTO, S.I. do C.; SOUZA, A. M. de; CARVALHO, D. de. Variabilidade Genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* desf em dois fragmentos de mata ciliar. **Sci. Florestalis**, n. 65, p. 40-48, June 2004.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

PRADO, P.; LIEBANO, R. E.; HOCHMAN, B.; PINFILDI, C. E.; FERREIRA, L. M. Modelo experimental para laserterapia de baixa intensidade em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, n. 4, p. 258-262, 2006.

PYTEL, R. F.; SILVA, L. V. N.; NUNES, A. S.; Estudo *in vivo* de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, supl. 3, p. S323-S328, 2005.

RIAZ, A. A.; WANG, Y.; SCHRAMM, R. SATO, T.; MENGER, M.D.; JEPSSONB.; THORLACIUS, H. Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. **FASEB J.**, 10.1096/fj. 03-050/fje. Publisehd on line Mar. 2004.

RHODEN, E. L.; TELÖKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C. A. LUCAS, M.L.; BELLÓ-KLEIN, A. . Effects of l-arginine and l-name on renal ischemia - reperfusion in rats. **Braz. J. Urol.**, v. 27, n. 1, p. 78-83, Jan./ Feb. 2001.

RODRIGUES, J. B. **Hortus Fluminensis**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1894.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**. Belém: Ed. Cejup, 1989.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SANTOS, C. H. M. dos; PONTES, J. C. D. V.; GOMES, O. M. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. **Rev Bras. Coloproct.**, v. 26, n. 1, p. 28-33, jan./mar. 2006.

SARIFAKIOGLU, N.; GOKREM, S.; ATES, L.; AKBUGA, U. B. ASLAN, G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. **Br. Assoc. Plast. Surg.**, v. 57, p. 769–772, 2004.

SCHANAIDER, A.; OLIVEIRA NETO, A. A. de; COSTA, I. R. da. Mannitol in reperfusion skin island flaps injury. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 14, n. 3, set. 1999.

SCHANAIDER A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 441-447, jul./ago. 2004.

SCHANAIDER, A.; MENEZES, V. J. M. T.; BORCHARDT, A. C.; OLIVEIRA, P. L. de; MADI, K. Proteínas teciduais oxidadas após lesão intestinal por reperfusão em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 434-436, 2005.

SILVA, J. A.; MACEDO, M. L. R.; NOVELLO, J. C. MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new Trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2001.

SILVA, J. R. M. **Contribuição para o estudo da flora brasileira**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1911.

SILVA, J. R. M. **Plantas medicinais e industriaes**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1923.

SILVA, J. R. M. **O Brasil e suas possibilidades**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1951.

SILVA, M. G. da; CASTRO, A. A.; RAMOS, E. A. G. PEIXOTO, E.; MIRANDA JR., F.; PITTA G.B.B.; COSTA, R.F.; JULIANO, Y. Efeitos histológicos e bioquímicos séricos do alfa-tocoferol na lesão de isquemia e reperfusão em membro pélvico de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 5, p. 375-381, 2005.

SILVA JR, O. de C. E.; CENTURION, S.; PACHECO, E.G. BRISOTTI, J.L.; OLIVEIRA, A.F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cir. Brás.**, v. 17, supl. 3, p. 96-100, 2002.

SILVEIRA, M. da; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **J. Vasc. Br.**, v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 6, p. 812-822, dez. 2004.

SIMMAN, R.; CWS; CRAFT, C.; MCKINNE, B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. **Ann. Plast. Surg.**, v. 54, n. 5, p. 546-552, May 2005.

SIMONETTI, G. **MacDonald Encyclopedia of Herbs and Spices**. Verona: MacDonald & CO, 1991.

SOUZA, A. F. R. D.; ABREU, C. L. B. **Arq. Jard. Bot.**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 93, 1977.

SOUZA FILHO, M. V. P. de; LEAL, P. R. L.; SBALCHIERO, J. C.; MARQUES, M. J. M. Efeito do extrato de Ginkgo Biloba na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 45-56, maio/ago. 2002.

SOUZA-MORAES, M. R.; DAVID-FILHO, R.; SILVA, J.C.C.B. ULIAN, M; FRANCO, M.F.; GABRIEL JUNIOR, A.; SMITH, B.; BURIHAN, E. Effect of antibodies to intercellular adhesion molecule type 1 on the protection of distant organs during reperfusion syndrome in rats. Effect of anti-ICAM-1 on reperfusion syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 605-612, 2003.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Multiple forms of endo-1,4-b-glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. **J. Exp. Bot.**, v. 54, n. 390, p. 2045-2052, Sept. 2003.

THIERRY, F.; STEPHAN, K.; SIGRID, G. PHILLIPE, N.; YVETTE, G.; FABRICE, P.; BERNARD, P.; GINETTE, D-D. Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and Myeloperoxidase activity. **Physiol. Res.**, 2007. *In press*.

TORRES, J. M. de S.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L. de. MARTINS, M.C.R.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.C. de Efeitos metabólicos da l-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Brás.**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 2003.

TYNER, T. R.; SHAHBAZIAN, R.; NAKASHIMA, J. KANE, S.; SIAN, K.; YAMAGUCHI, K.T. Propofol improves skin flap survival in a rat model: correlating reduction in flap-induced neutrophil activity. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n. 3, p. 273-277, Sept. 2004.

UHLE, V. A.; PICCINATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CHERRI, J. Efeito do Meloxicam sobre a lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 4, out./nov./dez. 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O. PINTO, A.C. 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.

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

WEBSTER, R. S.; MONTERO, E. F. S.; FAGUNDES, D. J.; ZETTLER, C. G.; COIRO, J. O papel do condicionamento isquêmico do músculo grácil de ratos na fase precoce da reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 80-86, 2006.

WOOD, H. C.; LAWALL, C. H.; YOUNGKEN, H. W. OSOL, A.; GRIFFITH, I.; GERSHENFELD, L. **The dispensatory of the United States of America**. 22nd ed. London: J.B. Lippincott Company, 1940.

YABE, Y.; KOBAYASHI, N.; NISHIHASHI, T.; TAKAHASHI, R.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, n. 3, p. 894-899, 2001.

YOSHIDA, W. B.; CAMPOS, E. B. P. de Isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos: efeitos do manitol e vitamina C na redução de áreas de necrose em modelo experimental no rato . **Acta Cir. Brás.**, v. 20, n. 5, p. 358- 363, 2005.

ZHANGA, F.; OSWALDA, T.; LINB, S. Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br. Assoc. Plast. Surg.**, v. 56, p. 653-659, 2003.

ZHANG, Y.; HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Endothelial cells and protection against oxidative stress adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase in human primary. **Circ. Res.**, v. 96, p. 831-837, 2005.

APÊNDICE A – Peso dos animais

Grupo Controle Salina (GGS)		
T24	T48	T168
184	240	245
200	265	210
185	300	230
230	265	295
220	275	275
215	240	265

Grupo Controle Veículo (GGV)		
T24	T48	T168
180	210	218
180	185	225
206	220	208
175	220	210
240	200	235
220	216	225

Grupo Teste 200 (GT200)		
T24	T48	T168
210	235	210
210	210	210
215	235	220
235	220	215
215	230	215
210	225	225

Grupo Teste 400 (GT400)		
T24	T48	T168
212	196	208
190	218	190
221	159	205
190	191	205
197	185	176
181	202	204

APÊNDICE B - Dados brutos (1)

TECIDO: TBARS		
Grupo Controle 1: Grupo GCS		
GCS_T24	GCS_T48	GCS_T168
0,0212	0,0145	0,0096
0,0324	0,0308	0,0369
0,0585	0,0963	0,0140
0,0443	0,0031	0,0235
0,0092	0,0192	0,0464
0,0849	0,0019	0,0260

PLASMA: TBARS		
Grupo Controle 1: Grupo GCS		
GCV_T24	GCV_T48	GCV_T168
0,119	0,062	0,038
0,011	0,064	0,039
0,100	0,072	0,070
0,102	0,073	0,071
0,176	0,026	0,035
0,179	0,027	0,036

TECIDO: TBARS		
Grupo Controle 2: Grupo GCV		
GCV_T24	GCV_T48	GCV_T168
0,0282	0,0072	0,0053
0,0051	0,006	0,0066
0,0309	0,0484	0,0495
0,1667	0,051	0,0041
0,0153	0,0128	0,0114
0,0126	0,011	0,0113

PLASMA: TBARS		
Grupo Controle 2: Grupo GCV		
GT200_T24	GT200_T48	GT200_T168
0,043	0,061	0,036
0,044	0,062	0,037
0,044	0,060	0,041
0,045	0,061	0,077
0,036	0,058	0,075
0,037	0,059	0,014

TECIDO: TBARS		
Grupo Teste 1 GT200mg		
GT200_T24	GT200_T48	GT200_T168
0,0046	0,0111	0,0085
0,0070	0,0110	0,0082
0,0046	0,0083	0,0045
0,0043	0,0081	0,0043
0,0080	0,0134	0,0380
0,0078	0,0130	0,0390

PLASMA: TBARS		
Grupo Teste 1 GT200mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
0,0147	0,0711	0,0289
0,0963	0,0793	0,0676
0,0982	0,0803	0,0685
0,085	0,0426	0,0555
0,0862	0,044	0,0566
0,0718	0,0282	0,0546

TECIDO: TBARS		
Grupo Teste 2 GT400mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
0,0109	0,0134	0,0323
0,0145	0,0132	0,0328
0,0120	0,0076	0,1010
0,0121	0,0083	0,1010
0,0120	0,0112	0,0270
0,0124	0,0066	0,0217

PLASMA: TBARS		
Grupo Teste 2 GT400mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
0,0540	0,0507	0,1237
0,1066	0,0555	0,0906
0,1079	0,0562	0,0903
0,0883	0,0804	0,1033
0,0876	0,0814	0,1047
0,0494	0,1224	0,0925

DADOS BRUTOS (2)

TECIDO: GSH		
Grupo Controle 1: Grupo GCS		
GCS_T24	GCS_T48	GCS_T168
4,613	3,660	6,730
6,323	5,307	4,177
6,373	4,433	5,743
6,537	7,020	7,667
7,520	3,577	7,390
7,457	4,547	6,123

PLASMA: GSH		
Grupo Controle 1: Grupo GCS		
GCV_T24	GCV_T48	GCV_T168
3,253	3,013	6,747
2,817	3,190	7,037
2,867	3,043	5,147
4,547	2,770	6,713
4,773	2,673	4,050
4,400	4,047	6,613

TECIDO: GSH		
Grupo Controle 2: Grupo GCV		
GCV_T24	GCV_T48	GCV_T168
5,437	4,823	5,290
5,470	5,517	5,323
4,303	7,033	5,463
4,563	7,070	5,193
5,470	10,493	21,463
5,453	10,560	23,147

PLASMA: GSH		
Grupo Controle 2: Grupo GCV		
GT200_T24	GT200_T48	GT200_T168
10,833	13,847	6,907
11,503	12,180	7,083
8,550	15,218	6,003
8,847	11,963	4,513
8,467	15,213	7,750
10,817	7,180	7,297

TECIDO: GSH		
Grupo Teste 1 GT200mg		
GT200_T24	GT200_T48	GT200_T168
6,943	11,700	8,313
7,827	10,413	9,330
6,017	16,600	47,577
6,083	16,733	45,263
17,770	3,823	33,280
6,943	14,617	33,767

PLASMA: GSH		
Grupo Teste 1 GT200mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
24,777	25,200	34,380
25,590	24,263	30,567
20,660	25,393	24,127
22,583	25,497	27,107
20,870	27,333	21,030
21,013	26,040	22,630

TECIDO: GSH		
Grupo Teste 2 GT400mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
29,643	28,270	23,680
10,063	19,803	24,167
32,570	27,283	20,833
32,713	26,833	22,613
17,750	21,090	21,180
19,413	21,403	21,467

PLASMA: GSH		
Grupo Teste 2 GT400mg		
GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
20,143	20,530	11,320
20,547	20,643	11,690
19,637	34,523	11,513
19,723	32,957	16,117
18,687	15,583	14,743
18,990	15,713	18,083

DADOS BRUTOS (3)

TECIDO: MPO

Grupo Controle 1: Grupo GCS

GCS_T24	GCS_T48	GCS_T168
0,502	0,850	3,482
0,371	0,752	5,511
0,626	0,690	2,825
0,928	0,764	3,529
0,824	0,595	4,486
0,9281	0,6028	5,1755

TECIDO: MPO

Grupo Controle 2: Grupo GCV

GCV_T24	GCV_T48	GCV_T168
3,347	2,445	2,114
3,863	2,541	2,338
3,662	2,517	2,424
3,938	1,658	1,283
3,986	1,062	1,194
4,0044	1,3084	0,9798

TECIDO: MPO

Grupo Teste 1 GT200mg

GT200_T24	GT200_T48	GT200_T168
0,042	0,805	0,136
0,183	0,108	0,134
0,153	0,078	0,127
0,154	0,043	0,129
0,135	0,241	0,190
0,1197	0,7332	0,1867

TECIDO: MPO

Grupo Teste 2 GT400mg

GT400_T24	GT400_T48	GT400_T168
0,1356	0,2380	0,0902
0,1336	0,0398	0,0943
0,1268	0,0438	0,0889
0,1292	0,0469	0,0658
0,1897	0,3104	0,0762
0,1867	0,2636	0,7888

ANEXO A – Componentes do óleo de copaíba

No. Sesquiterpeno	
S1	Alo-Aromadendreno
S2	Ar-Curcumeno
S3	α -Bergamoteno
S4	β -Bergamoteno
S5	Biciclogermacreno
S6	β -Bisaboleno
S7	β -Bisabolol
S8	α -Bourbouneno
S9	Cadaleno
S10	Cadineno
S11	α -Cadineno
S12	δ -Cadineno
S13	γ -Cadineno
S14	α -Cadinol
S15	Calameneno
S16	Calareno
S17	Cariofileno
S18	β -Cariofileno
S19	α -Cariofilenol
S20	Cedrol
S21	α -Cedreno
S22	Cipereno
S23	Copaeno
S24	α -Copaeno,
S25	β -Copaeno
S26	Cubebeno
S27	α -Cubebeno
S28	β -Cubebeno
S29	1,5-Dimetil-8-isopropilciclodeca-1,4-dien-8-ol
S30	α -Elemeno
S31	β -Elemeno
S32	δ -Elemeno
S33	γ -Elemeno
S34	β -Farneseno
S35	<i>trans</i> - β -Farneseno
S36	Fonenol
S37	Germacreno B
S38	Germacreno D
S39	α -Guaieno
S40	β -Guaieno
S50	γ -Guaieno
S51	Guaiol
S52	α -Gurjuneno
S53	Himacheleno

S54	Humuleno
S55	α -Humuleno
S56	β -Humuleno
S57	γ -Humuleno
S58	Ledol
S59	Longiciclono
S60	Longifoleno
S61	Longipineno
S62	α -Multijugenol
S63	t-Muurolol
S64	α -Muuroleno
S65	γ -Muuroleno
S66	Óxido de cariofileno
S67	α -Selineno
S68	β -Selineno
S69	β -Sesquifelandreno
S70	Veridiflorol
S71	β -Vetiveneno
S72	α -Ylangene

Tabela. Diterpenos encontrados nos óleos de copaíba (VEIGA-JÚNIOR; PINTO,2002)

No. Constituintes Referências

Cauranos

D1	Ácido <i>ent</i> -16- β -caurano-19-óico
D2	Ácido <i>ent</i> -caura-16-eno-19-óico

Clerodanos

D3	Ácido 3,13-clerodadieno-15,16-olídeo-18-óico (Ácido patagônico)
D4	Ácido 3-clerodeno-15,18-dióico
D5	Ácido 13-clerodeno-15,16-olídeo-18-óico
D6	Ácido clerodano-15,18-dióico
D7	Ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-13(16),14-clerodadieno-18-óico (Ácido clorechínico)
D8	Ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (Ácido hardwíckiico)
D9	Ácido 15,16-epóxi-7 β -acetóxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico 185a, 190 ^a (Ácido 7-acetóxi-hardwíckiico; 7a-acetoxibacchotriconeatina D)
D10	Ácido 3,13-clerodadieno-15-óico (Ácido colavênico)
D11	3,13-clerodadieno-15-ol (Colavenol)
D12	Ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-7 β -hidróxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (Ácido 7-hidróxi-hardwíckiico)
D13	<i>ent</i> -(19a)-3,13-clerodadieno-15-ol (cis-colavenol)
D14	<i>ent-neo</i> -4(18), 13-clerodadien-15-ol

Labdanos

- D15 Ácido 18-hidróxi-8(17), 13-labdadieno-15-óico (Ácido copaiferólico)
D16 Ácido 8(17), 13E-labdadieno-15-óico (Ácido copaiférico)
D17 Ácido (13S)-7-labdeno-15-óico (Ácido catívico)
D18 3 β -hidróxi-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-13-ona
D19 8(17), 13-labdadieno-15-ol
D20 Ácido *ent*-11-hidróxi-labda-8(17), 13-dieno-15-óico (Ácido 11-hidróxi-copálico) 66d ,
D21 Ácido *ent*-3-hidróxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico
D22 Ácido *ent*-8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (Ácido *ent*-agático)
D23 Ácido *ent*-8(17)-labdeno-15-óico (Ácido eperúico)
D24 Ácido *ent*-8(17)-labdeno-15,18-dióico (Ácido eperu-8 (20)-15, 18-dióico) D25
Ácido *ent*-15,16-epóxi-8(17), 13(16),14-labdatrieno-18-óico (Ácido poliáltico)
D26 Ácido *ent*-8(17)-13E-labdadieno-15-óico (Ácido copálico)
D27 Ácido *ent*-11-acetóxi-8(17)-13E-labdadieno-15-óico (Ácido 11-acetóxi-copálico)

Quadro 1 – Sesquiterpenos, dipertenos e demais componentes já detectados em óleos de copaíba (VEIGA-JÚNIOR; PINTO,2002)

ANEXO B – Estudos experimentais

Autor(es)	Drogas Estudadas
Schanaider <i>et al.</i> , 1999	Manitol
Biondo-Simões <i>et al.</i> , 2000	Buflomedil
Acevedo-Bogado <i>et al.</i> , 2002	Hialuronidase
Souza Filho <i>et al.</i> , 2002	Ginkgo Biloba
Ghavami, A.; Nutt, M.P.; Hardy, S. P.; 2002	Aspirina
Huemer <i>et al.</i> , 2002 Mc Donald <i>et al.</i> , 2004	Óxido Nítrico
Zhang <i>et al.</i> , 2003 Lineaweaver <i>et al.</i> , 2004 Meirer <i>et al.</i> , 2007	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
Komorowska-Timek <i>et al.</i> , 2004	L-Arginina
Atabay <i>et al.</i> , 2004	Lidocaína + Epinefrina
Tyner <i>et al.</i> , 2004	Propofol
Sarifakioglu <i>et al.</i> , 2004 Hart <i>et al.</i> , 2006	Sildenafil
De Almeida <i>et al.</i> , 2004	Dimetil-Sulfóxido
Esteves Júnior; Ferreira; Liebano, 2004	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Fonseca <i>et al.</i> , 2004	Terazosina e propranolol
Abla <i>et al.</i> , 2005	Acetilcisteína
Bittencourt <i>et al.</i> , 2005	Minoxidil
Yoshida; de Campos, 2005	Manitol e Vitamina C
Esteves Júnior <i>et al.</i> , 2005	Cloridrato de Hidralazina
Aydogan <i>et al.</i> , 2006	Ácido Caféico
Mauad Junior <i>et al.</i> , 2006	Buflomedil e Pentoxifilina
Ersoy <i>et al.</i> , 2007	Clopidogrel

QUADRO 2 - Drogas utilizadas na prevenção das lesões oxidativas em retalhos de pele randomizados em ratos.

ANEXO C – Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 36/06, sobre o projeto intitulado: “EFEITOS DA COPAIFERA LANGSDORFFU DESF. NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS” está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 21 de novembro de 2006.

Fortaleza, 30 de novembro 2006


Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA