

EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapaguianensis*Aubl.) NA CICATRIZAÇÃO E CONTROLE INFLAMATÓRIO ORAL – ESTUDO EXPERIMENTAL

Jessica Teixeira GOMES

GOMES, Jessica Teixeira. **Eficácia da administração do óleo de andiroba (*carapaguianensis*aubl.) na cicatrização e controle inflamatório oral – estudo experimental.** Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2021.

A mucosite oral (MO) é uma complicação advinda de tratamentos oncológicos, caracterizada pelo seu caráter inflamatório e por promover, do ponto de vista clínico, o desenvolvimento de edema, eritema e ulcerações gerando desconforto, dores e elevando o risco de infecção nas membranas da mucosa oral e sistêmica. As condutas normalmente utilizadas visam a medidas paliativas, atuando na sintomatologia, como uso de analgésicos, crioterapia, anestésicos tópicos, antifúngicos, antissépticos, antivirais, antibióticos, antiinflamatórios, laser em baixa intensidade e fitoterápicos. A administração de fitoterápicos ainda encontra barreiras no seu uso, em virtude da pouca documentação técnico-científica e de

poucos estudos que realmente evidenciam clinicamente vantagens de uso. Os medicamentos fitoterápicos como a Andiroba (*Carapaguianensis aubl*) são alternativas viáveis em virtude da ação antiinflamatória, antimicrobiana e analgésica, atendendo aos fins terapêuticos, além da alta disponibilidade na região amazônica, o baixo custo e o vasto conhecimento popular a respeito dessa espécie (SOARES *et al.*, 2020; WANZELER *et al.*, 2017). A andiroba apresenta propriedades dermatológicas, reumáticas, anti-inflamatórias, antibacterianas e cicatrizantes, sendo, então, uma alternativa eficaz para o tratamento da MO. Em vista disso, esta investigação visa a avaliar o efeito cicatrizante e antiinflamatório da andiroba (*CarapaGuianensisAubl*), através de indução de MO por quimioterápico em hamsters, como uma nova alternativa de tratamento de MO, de fácil acesso à população. A etiologia dessa lesão é decorrente a tratamentos oncológicos, como tratamentos radioterápicos e quimioterápicos. Essas terapias, além de atingir células neoplásicas, também afetam células saudáveis e resultam em efeitos colaterais, como a MO, xerostomia, hemorragias, prejudicando a qualidade de vida e as funções orais básicas do indivíduo (SPIEZZA, 2015). Os

tratamentos envolvem medidas a fim de restabelecer a perda tecidual, diminuir agentes que induzam a proliferação da MO, e promover o alívio da sintomatologia dolorosa. Anti-inflamatórios, crioterapias, uso de enxaguantes bucais, antimicrobianos, anestésicos tópicos, analgésicos (SANTOS, 2009; YAROM *et al.*, 2020), além da possibilidade do uso de *laser* de baixa potência (CURRA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2020) e substâncias fitoterápicas são alternativas frente ao combate da MO (SOARES *et al.*, 2020; YAROM *et al.*, 2020; HITOMI, UJIHARA & ONO, 2019; WANZELER *et al.*, 2017) A patogênese da MO é dividida em 5 fases, sendo a primeira caracterizada pelo início da lesão tecidual e a segunda, de Geração de Mensagem, pela ativação da liberação do fator nuclear kappa b (NF-kB), responsável por regular os fatores de transcrição e ativar as citocinas pró-inflamatórias. Na terceira fase, observa-se o aumento de sinais da ativação das citocinas; na quarta fase, a presença de ulcerações, com consequente entrada de bactérias e/ou infecções sistêmicas; e, na quinta fase, a completa integridade do epitélio e seu restauro. Diante disso, a avaliação da expressão de NF-kB auxilia no acompanhamento da manifestação inflamatória e na

melhora do quadro clínico dos pacientes oncológicos (CURRA *et al.*, 2013; CURRA *et al.*, 2015). Por haver envolvimento de animais no estudo, o projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA), do Centro Universitário do Pará (CESUPA), sob o parecer n 07/2016. Os cuidados foram baseados na lei de uso e criação de animais preconizada pela lei federal n 11794 de 08 de outubro de 2008, com decreto de n 6899, em 15 de julho de 2009, agindo de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos realizados procuraram minimizar o desconforto e qualquer sofrimento dos animais, além da utilização do menor número possível, baseado nos dados estatísticos de cálculo amostral. Foram utilizados hamsters sírios dourados, machos, com peso variando de 90 a 130 g, com idades de 6 a 8 semanas, advindos do biotério do Instituto Evandro Chagas, (Belém, Pará). Os animais foram armazenados em gaiolas de plástico, previamente identificados, com livre acesso à água e ração. Foram pesados diariamente para acompanhamento de variação de massa corpórea. A utilização de hamsters ocorreu pela facilidade de acesso e observação das mucosas jugais, e pelo fazer de tolerância

às doses de quimioterápicos para indução de MO, sem apresentar uma quantidade significativa de óbitos. O óleo da andiroba utilizado foi da Floresta Nacional do Tapajós, localizada a oeste do [Estado do Pará](#), abrangendo os municípios de [Belterra](#), [Aveiro](#), [Rurópolis](#) e [Placas](#). Essa floresta faz limite com o [Rio Tapajós](#), com a rodovia [BR 163](#) Santarém-Cuiabá e com o rio Cupari, e tem coordenadas 3° 31' 1" S, 55° 4' 23" W. Dentro da floresta, esse óleo foi produzido na Comunidade Nossa Senhora do Rosário, Vila Santa Fé, no Km 200 norte e km 67 da BR, no município de Uruará -- PA. A Comunidade pertence à Associação agroextrativista Sementes da Floresta e possui registro concedido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária do Brasil. A empresa em questão forneceu um laudo comprovando a qualidade da andiroba utilizada. A indução de MO foi realizada com quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) e subsequente indução mecânica, de acordo com o protocolo proposto por Sonis *et al.* (1990). O tamanho da amostra foi baseado nos estudos de Wanzeler *et al.* (2017), o qual objetivou avaliar o efeito cicatricial de fitoterápico através de indução de MO em hamsters sírios dourados. Ocorreram duas formas de indução de MO, a química e a mecânica. A indução química se deu com a

administração do quimioterápico 5-FU (*Fluoro-Uracil® 250mg/10ml, ICN Farmacêutica Ltda*), comumente utilizado em tratamento de câncer, com administração intraperitoneal em hamsters, nos dias D0, D5 e D10 do experimento nas dosagens de 60kg/mg por peso. Para a indução mecânica, os animais foram previamente anestesiados com Ketamina, na dose de 80 mg/kg, associada à Xilazina, na dose de 20 mg/kg, pela via intraperitoneal. Após verificação de que o animal se encontra em plano anestésico, não apresentando qualquer reação aos testes de reflexos interdigitais e movimentação de vibrissas, foi realizada a hiperextensão da mucosa jugal e a fixação. Foram realizadas duas ranhuras superficiais em ambas mucosas, visando a potencializar a MO, seguindo o protocolo de Sonis *et al.* (1990). Essa conduta foi realizada por um único operador, previamente treinado. A administração tópica de andiroba ocorreu com o auxílio de cotonetes flexíveis, com fricção vigorosa sobre a superfície da mucosa, para que a medicação fosse distribuída de maneira mais homogênea por toda mucosa do animal. O manuseio da andiroba ocorreu dos dias D3 a D15, com aplicação três vezes ao dia, e os animais isentos, por uma hora, da administração de água e alimentação,

visando à maior absorção do medicamento, evitando qualquer tipo de interferências. O estudo foi composto por 66 animais, agrupados em 4 grupos: Grupo I- Andiroba, Grupo II- Controle Positivo (tratamento), Grupo III- Grupo Controle negativo e Grupo IV- Grupo ciclofosfamida (controle toxicidade) para análise bioquímica. Com a randomização dos animais, antes a formação dos grupos.

Grupo Andiroba: Composto por 28 hamsters foram submetidos à indução de MO, a partir do que, houve a administração tópica de andiroba, com o auxílio de hastes flexíveis de plástico e algodão (cotonetes), para melhor aplicação na superfície da mucosa, 3 vezes ao dia, durante 15 dias. Os grupos que receberam administração tópica de andiroba não receberam alimentos e água por 1 hora, para que ocorresse a completa e maior absorção da medicação. Nos dias D4, D8, D12 e D15, realizou-se a fotografia das mucosas para posterior análise clínica e eutanásia dos animais com a remoção de sangue (análise bioquímica) e as mucosas jugais removidas e armazenadas em formol tamponado 10% (análise imuno-histoquímicas). **Grupo Controle Positivo:** Composto por 28 hamsters induzidos à MO, como preconizado pelo protocolo de indução, entretanto sem qualquer tipo de tratamento para esse

grupo. Nos dias D4, D8, D12 e D15, realizou-se a fotografia das mucosas para posterior análise clínica e eutanásia dos animais com a remoção de sangue (análise bioquímica) e as mucosas jugais removidas e armazenadas em formol tamponado 10% (análise imuno-histoquímicas). **Grupo Controle Negativo:** Composto por 5 hamsters, nos quais não houve nenhuma intervenção e tratamento. Nos dias D4, D8, D12 e D15, realizou-se a fotografia das mucosas para posterior análise clínica e eutanásia dos animais com a remoção de sangue (análise bioquímica) e as mucosas jugais removidas e armazenadas em formol tamponado 10% (análise imuno-histoquímicas). **Grupo Ciclofosfamida:** Composto por 5 hamsters, sendo o grupo controle para a toxicidade, com administração do quimioterápico ciclofosfamida a uma dose de 1000mg/kg em cada animal, através de gavagem, conforme preconizado pelas diretrizes para testes experimentais OECD. Esse grupo de animais foi utilizado apenas para análise bioquímica. No dia D15, realizou-se a eutanásia dos animais com a remoção de sangue (análise bioquímica). Houve a realização da imunomarcação utilizando os anticorpos primários TGF- β e NF-KB, de acordo com o protocolo de Ribeiro *et al.* (2017) pela técnica

da imunoperoxidase (avidina-biotina-peroxidase). As amostras das mucosas jugais dos grupos foram desparafinizadas em diferentes concentrações de xilol e reidratada. Posteriormente, foram lavadas com 0,3 % Triton X-100 em tampão fosfato, seguido de administração de peroxidase endógena (3% de peróxido de hidrogênio) e incubados com os anticorpos primários (1:400) por 12 h a 4°C e depois com anticorpo secundário biotinilado. As lâminas foram coradas com tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina e com hematoxilina de Harris. Os anticorpos primários da Santa Cruz Biotechnology utilizados foram: anti-NFKB p56 Coelho policlonal (1:400; E379) e anti-TGF- β policlonal de coelho (1:400; sc-146). Os escores foram realizados pelo método semiquantitativo, por meio do qual foram avaliados cinco fragmentos de tecido de cinco animais por grupo. O protocolo de mensuração dessa imunomarcção foi baseado de acordo com a porcentagem de tecido corado, como proposto por curra *et al.* (2013), utilizando o seguinte sistema de pontuação: Negativo (-) = 0%, 1+ = 1-10% de coloração positiva/mm², 2+ = 11-25% de coloração positiva/mm², 3+ = 26-50% de coloração positiva/mm², 4+ = 51- 75% de coloração positiva/mm², 5+ = maior/igual a

76% de coloração positiva/mm². Houve a avaliação de 28 mucosas do grupo andiroba, 28 mucosas do grupo controle positivo e 5 mucosas do controle negativo. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos para analisar os possíveis sinais de toxicidade dos tratamentos em questão, averiguando as possíveis alterações renais, hematológica e hepática. No 15^o dia de experimento, antes dos animais serem eutanasiados, houve a remoção de sangue, em seringas devidamente heparinizadas, que posteriormente foram para a centrifuga por 10 minutos a 3500 rpm, para haver a separação do soro para a análise bioquímica de ureia, creatinina, transaminas e glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), gama GT, fosfatase alcalina, amilase e lipase. A leitura foi realizada no aparelho analisador automático bioquímico Chem Well T (Labtest) com sistemas comerciais e manuais do próprio fabricante. As imagens fotografadas foram mescladas e codificadas pelo operador, e, posteriormente, levadas à análise para um examinador avaliar de maneira cega, sem qualquer conhecimento a respeito de grupos ou tratamentos. Esses examinadores contaram com o auxílio de uma tabela preconizada por Lima *et al.* (2005), para contribuir na

avaliação do grau de severidade da MO, por apresentar um menor número de escores, facilitando, assim, o momento da avaliação. Essa tabela classifica a MO em 4 scores. O óleo foi analisado por meio da cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), utilizando um cromatógrafo de gás (modelo Varian CP 3380) equipado com um detector de íons e com uma coluna capilar CP-Sil 88 (comprimento 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura da película 0,25 µm; Varian Inc., EUA). Esse protocolo promove a conversão dos ácidos graxos contidos no óleo em ácidos graxos ésteres metílicos (FAMES). A temperatura da coluna foi ajustada para 80° C, durante 4 minutos, e aumentada para 205° C a uma taxa de 4° C/min. O software utilizado para quantificação dos ácidos graxos, confecção de cromatogramas e misturas de ácidos graxos padrão (Nu-check-prep, Inc., EUA) foi o Varian Star 3.4.1. Os valores dos ácidos graxos foram quantificados em percentagens relativas de ácidos totais. Os testes estatísticos escolhidos variaram de acordo com os padrões de normalidade e anormalidade da amostra. Para a análise bioquímica foi utilizado o teste estatístico ANOVA e para a análise imunohistoquímica ANOVA a um critério com comparações múltiplas de Fisher (LSD). Na avaliação

clínica, foi utilizado o teste Kruskal Wallis com pos-teste de Dunn, fSe utilizou o programa Biostat 5.0 e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA, considerando o nível de significância aceito de 5%. Para TGF- β , houve uma superexpressão em tratamentos de andiroba 100% ($p < 0.0001$), quando comparados ao grupo controle negativo, com uma expressão média da andiroba de 1.3461 ± 0.1378 . No grupo controle positivo, a expressão média do grupo andiroba foi inferior 0.6100 ± 0.1491 . O tgf b é um fator de crescimento com ação anti-inflamatória, que auxilia na homeostase tecidual. A sua superexpressão nos sugere uma possível melhora inflamatória e aceleração cicatricial. Ao avaliarmos o NFkB, a expressão média da andiroba, em relação ao controle positivo, foi de 0.6568 ± 0.1438 e a expressão média, em relação ao controle negativo, foi de 1.3715 ± 0.2068 . De acordo com a expressão relativa de TGF- β e NF-KB, o tratamento de andiroba repercutiu positivamente no quadro inflamatório da MO. O óleo de andiroba não demonstrou evidencias significativas de toxicidade, em comparação ao grupo controle. Entretanto foi possível identificar uma pequena diferença numérica de expressão de TGO, bilirrubina e CKNAC CPK, nos animais submetidos ao tratamento

fitoterápico. Apesar dessa diferença numérica, isso não é considerado uma alteração patológica, pois se apresenta ainda dentro dos padrões referencias de expressão. Ressalta-se que os animais foram submetidos a fatores de estresse e medicações (anestésicas), que podem ter influenciado direta ou indiretamente nesses dados. Sendo assim, o óleo da andiroba pode ser uma alternativa viável no tratamento de MO, sem apresentar danos significativos e irreversíveis. Na análise clínica, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo óleo de andiroba em relação ao grupo controle. A análise do teste de kruskal wallis (Post hoc Dunn) mostrou que o tratamento com óleo de andiroba apresentou menor valor médio (escores), demonstrando resultados clínicos positivos nos dias 4 e 8 de experimento. No dia 12 e 15, os escores apresentaram médias maiores para o grupo PC, seguido do grupo óleo de andiroba. Para a caracterização do óleo de andiroba, foi empregada a cromatografia gasosa com perfilamento. Na análise lipídica, foi observado que o óleo de andiroba/produto é composto por 12 substâncias saponificantes, sendo também rico em ácidos graxos quando extraído de sua semente. A partir dos resultados, foi constatado que as porcentagens mais elevadas dos

compostos lipídicos foram, respectivamente, do ácido oleico (47,33%), ácido palmítico (31,46%), ácido linoleico (8,98%) e ácido esteárico (7,12%). A fitoterapia utilizada pela população científica necessita de respostas sobre o efeito toxicológico e intracelular da atividade cicatricial na mucosa bucal e essa pesquisa veio como alternativa de responder tais questionamentos. O óleo de andiroba possui componentes saponificáveis e insaponificáveis. Os saponificáveis incluem os ácidos graxos, particularmente os ácidos palmítico, oleico, esteárico e linoleico (BARROS *et al.*, 2012), e os insaponificáveis incluem triterpenos, tetraterpenos, alcaloides e limonoides (FERRARIS *et al.*, 2011). As propriedades limonoides têm maior visibilidade em termos de efeitos terapêuticos, em análises científicas (NINOMIYA *et al.*, 2016), e uma pequena parte dos artigos estuda os componentes saponificáveis, que correspondem à maior porção no óleo. Os ácidos linoleico e oleico desempenham um papel importante na regulação da colagenase e na produção de metaloproteínas, na indução da granulação e liberação de citocinas, estimulam a angiogênese e a revascularização e, conseqüentemente, aceleram a cicatrização de feridas. Esse potencial pode explicar a redução significativa da MO no grupo andiroba.

Pode-se concluir que o óleo de andiroba é um tratamento eficaz na cicatrização e na melhora inflamatória de MO, em modelo experimental, sendo de um custo inferior aos tratamentos padrões e com método de fácil aplicação, e que o tratamento com o fitoterápico não demonstrou alterações bioquímicas significativas, sendo uma alternativa interessante por não apresentar toxicidade. É necessário que estudos clínicos sejam realizados para evidenciarem sua eficácia em maior proporção.

REFERÊNCIAS

CURRA, M. *et al.* Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF-kB. **Journal of Biomedical Optics**, 2015.

CURRA, M.; MARTINS, M.A.T.; LAUXEN, I.S; PELLICOLI, A.C.A.; SANT'ANA FILHO, M.; PAVESI, V.C.S.; CARRARD, V.C.; MARTINS, M.D. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1b and TNF-a in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **Cancer ChemotherPharmacol.** v. 71, p. 293-299, 2013.

HITOMI, S., UJIHARA, I., ONO, K..Pain mechanism of oral ulcerative mucositis and the therapeutic traditional herbal medicine hangeshashinto. **Journal of Oral Biosciences**, 2019.

LIMA, V.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; REBOUÇAS, C.G.; FALCÃO, B.A.; AUGUSTO, R.F., SOUZA, M.L.; LEITÃO, B.T.; RIBEIRO, R.A. Effects of the tumor necrosis fator-alpha inhibitors pentoxifyline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Science**. v. 113, n. 3, p. 210-217, 2005.

SANTOS, P. S. da S. Mucosite oral: perspectivas atuais na prevenção e tratamento, **RGO**, Porto Alegre, v. 57, n.3, p. 339-344, 2009.

SOARES, A. dos S..Therapeutic effects of andiroba (CarapaguianensisAubl) oil, compared to low power laser, on oral mucositis in children underwent chemotherapy: A clinical study. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

SONIS, S.T.; TRACEY, C.; SHKLAR, G.; JENSON, J.; FLORINE, D. Na model for mucositis induced by câncer chemotherapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 69, n. 4, p. 437- 443, 1990.

SPIEZZA S., Mucosite Oral. **Journal Oral Invest**, 4(1): 14-18, 2015.

YAROM, N *et al.* Systematic review of natural and miscellaneous agents, for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines — part 2: honey, herbal compounds, saliva stimulants, probiotics, and miscellaneous agentes. **SupportiveCarein Cancer**, 2020.

WANZELER, A.M.V., ALVES Júnior, S.M., GOMES, J.T., GOUVEIA, E.H.H., HENRIQUES, H.Y.B., CHAVES, R.H., SOARES, B.M., SALGADO, H.L.C., SANTOS, A.S., TUJI, F.M., 2017. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapaguianensis*Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters. **Clinical Oral Investigations** 22, 2069-2079. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2300-2>.

BARROS, F.N., FARIAS, M.P.O., TAVARES, J.P.C., ALVES, L.C., FAUSTINO, M.A.G., 2012. In vitro efficacy of oil from the seed of *carapa guianensis* (andiroba) in the control of *felicola subrostratus*. **Brazilian J. Pharmacogn.** 22,1130-1133.<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000047>

FERRARIS, F.K., RODRIGUES, R., DA SILVA, V.P., FIGUEIREDO, R., PENIDO, C. ET AL, 2011. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **International Immunopharmacology** 11,1-11. doi:10.1016/j.intimp.2010.09.010

NINOMIYA, K., MIYAZAWA, S., OZEKI, K., MATSUO, N., MURAOKA, O. *et al.*, 2016. Hepatoprotective limonoids from andiroba (*carapa guianensis*). **International Journal of Molecular Sciences** 17,591. doi: 10.3390/ijms17040591