



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**JHÉSSICA KRHISTINNE CAETANO FROTA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro*  
DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke**

**Santarém-Pará  
2018**

**JHÉSSICA KRISTINNE CAETANO FROTA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro*  
DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará para obtenção do Título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira.

**Santarém-Pará  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

F941a Frota, Jhéssica Khistine Caetano  
Avaliação química e atividade antitumoral *in vitro* do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke / Jhéssica Khistine Caetano Frota. – Santarém : UFOPA, 2018.  
58 f.: il.  
Inclui bibliografias.

Orientadora: Elaine Cristina Pacheco de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Copaíba. 2. Óleo-resina. 3. Câncer. I. Oliveira, Elaine Cristina Pacheco de, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 615.535

---

**JHÉSSICA KRHISTINNE CAETANO FROTA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro*  
DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará para obtenção do Título de Mestre em Biociências.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira.

**Conceito:** \_\_\_\_\_

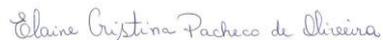
**Data de Aprovação** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Kelly Cristina Ferreira Castro  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA



Prof<sup>o</sup> Dr. Waldiney Pires Moraes  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira  
Orientadora - UFOPA

Dedico esta Dissertação de Mestrado primeiramente a Deus, pois a Ele toda honra e glória, aos meus queridos pais Olina Patrícia dos Santos Caetano e Waldemar Frota Silva, aos meus irmãos Wanessa Caetano, Edmundo Neto e Rafael Pedro. E a todos os meus familiares e amigos que sempre oraram e torceram por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me sustentado e fortalecido em todos os momentos e por Sua imensa fidelidade durante toda a minha vida. Toda honra e glória pertencem somente a Ti Senhor!

À minha mãe Olina Patrícia dos Santos Caetano, e ao meu pai Waldemar Frota Silva que hoje está no céu com o Senhor Jesus, tudo o que sou hoje é graças a vocês. Agradeço eternamente.

Aos meus irmãos Wanessa K. Caetano Frota, Edmundo Rodolfo Silva Neto e Rafael Pedro Caetano Frota, por toda força e apoio que sempre me deram e por intercederem por mim em suas orações. Muito obrigada.

Aos meus familiares, especialmente a minha avó Evanise dos Santos Caetano, meus tios Cristina Caetano, Fábio Márcio, Daniele Santos, Marcus Davi e às suas famílias.

Aos meus irmãos em Cristo que sempre oram e torceram por mim, especialmente: Jorge Ferreira e família, Gleice Vânia e Nelson Cardoso, Josiane Paz, Deusarina, e a todos os membros dos nossos grupos familiares: Células Deus Conosco, El Roy e Ovelhas de Jesus.

Agradeço também à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira pela orientação, aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Rayana Brito, Josiane Almeida, Cássio Figueira, Iasmin Paranatinga, Clícia Poliana e a técnica Taiara Picanço.

Ao professor Dr. Lauro Barata pelo apoio, ao Gilberto Franchi pesquisador do CIPOI/UNICAMP por todo o auxílio nas análises realizadas, ao professor Dr. Adilson Sartoratto pesquisador do CPQBA/UNICAMP por todo auxílio nas análises químicas, a Mariana Messias (UNICAMP), a professora Dr<sup>a</sup>. Kelly Castro (UFOPA), a Katiane Lourido e a Bruna Martins técnica do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos (P&DBio).

Obrigada a todos. Que Deus os abençoe!

Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito.

(Romanos 8:28)

## RESUMO

A copaíba é uma das árvores nativas mais utilizadas na região Amazônica devido o seu grande potencial farmacológico. O óleo-resina produzido pela copaíba é amplamente utilizado para fins medicinais possuindo várias atividades biológicas comprovadas, dentre elas a antitumoral. O câncer é a segunda doença que mais causa mortes no Brasil, e a investigação do potencial antitumoral do óleo de copaíba é uma alternativa para a formulação de novos fármacos que combatam esta doença. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição química e a atividade antitumoral *in vitro* do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke. A coleta do óleo foi realizada na Floresta Nacional do Tapajós, Belterra-PA. O óleo foi fracionado através de destilação simples para obtenção das frações volátil e resinosa. Para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas oito concentrações do óleo-resina total e de suas frações nas linhagens tumorais MCF7 (câncer de mama), HOS (osteossarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata) e H1299 (carcinoma pulmonar), e nas linhagens leucêmicas: Nalm 6 (leucemia B) e Jurkat (leucemia T), através do ensaio do MTT - Método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5 difenil-2-H-brometo de tetrazolium. A determinação da IC50 (concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo) foi realizado através de regressão não linear pelo software Origin 8.0 e os gráficos gerados pelo Software GraphPad Prism 2007. A composição química do óleo-resina foi analisada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e a identificação dos compostos por comparação de seus espectros de massas (EM) e do Índice de retenção (IR) com os dados disponíveis na biblioteca NIST versão 2.0 e ADAMS, 2007. Na análise da composição química do óleo-resina de *C. reticulata* foram identificados vinte e seis sesquiterpenos e seis diterpenos, corroborando com os trabalhos disponíveis na literatura sobre a composição química do óleo de espécies do gênero *Copaifera*, onde o maior percentual de substâncias são pertencentes à classe sesquiterpênica. O óleo-resina bruto e suas frações volátil e resinosa apresentaram citotoxicidade às linhagens cancerígenas testadas, comprovando assim, o potencial anticancerígeno do óleo de *C. reticulata* Ducke. Dentre as amostras estudadas, a fração resinosa (FR) obteve destaque pois apresentou a menor IC50, onde em menores concentrações de FR, inibiu 50% da viabilidade das células neoplásicas testadas. Na quantificação da apoptose da linhagem mais sensível aos tratamentos (H1299-carcinoma pulmonar), a fração resinosa demonstrou maior percentual de indução à morte celular.

**Palavras-chave:** Óleo-resina de copaíba; Câncer; Atividade antitumoral.

## ABSTRACT

Copaiba is one of the most used native trees in the Amazon region due to its great pharmacological potential. The oleoresin produced by copaiba is widely used for medicinal purposes having a number of proven biological activities, including antitumor. Cancer is the second most deadly disease in Brazil, and the investigation of the antitumor potential of copaiba oil is an alternative for the formulation of new drugs to combat this disease. Thus, the objective of the present work was to evaluate the chemical composition and in vitro antitumor activity of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. The oil was collected in the Tapajos National Forest, Belterra-PA. The oil was fractionated by simple distillation to obtain the volatile and resinous fractions. Eight concentrations of total oleoresin and its fractions in the MCF7 (breast cancer), HOS (osteosarcoma), PC3 (prostate adenocarcinoma) and H1299 (lung carcinoma) and in the leukemic lineages were used to evaluate anti-tumor activity in vitro.: Nalm 6 (leukemia B) and Jurkat (T-leukemia), by the MTT-Method 3- (4,5-dimethyl-2-thiazole) -2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide salt. The determination of IC 50 (inhibitory concentration capable of causing 50% of the maximum effect) was performed through non-linear regression by the Origin 8.0 software and the graphs generated by the GraphPad Prism 2007 Software. The chemical composition of the oleoresin was analyzed by Gas Chromatography coupled to Spectrometry and the identification of compounds by comparison of their mass spectra (MS) and the retention index (IR) with the data available in the NIST library version 2.0, ADAMS, 2007 and in the literature. In the analysis of the chemical composition of the *C. reticulata* oleoresin, twenty six sesquiterpenes and six diterpenes were identified, corroborating with the works available in the literature on the chemical composition of the oil of species of the *Copaifera* genus, where the highest percentage of substances belong to the class sesquiterpene. The crude oleoresin and its volatile and resinous fractions presented cytotoxicity to the tested carcinogenic strains, thus proving the anticancer potential of *C. reticulata* Ducke oil. Among the samples studied, the resinous fraction (FR) was highlighted because it presented the lowest IC50, where in the lower concentrations of RF, it inhibited 50% of the viability of the neoplastic cells tested. In the quantification of apoptosis of the lineage most sensitive to treatments (H1299-lung carcinoma), the resinous fraction showed a higher percentage of induction to cell death.

**Key words:** Copaiba oleoresin; Cancer; Antitumor activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Diferença entre os tipos de tumores. Fonte – Mariana F. Teles (INCA, 2017).....	13
<b>Figura 2</b> – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	15
<b>Figura 3 e 4</b> – Árvores de copaíba. Fonte – Cássio Figueira.....	17
<b>Figura 5</b> – (a) Perfuração; (b) Corte transversal do tronco; (c) Canais secretores longitudinais. Fonte – Alencar (1982).....	18
<b>Figura 6 e 7</b> – Flores, folhas e frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i> . Fonte – <a href="http://www.arvores.brasil.nom.br/nex/copaiba/index.htm">www.arvores.brasil.nom.br/nex/copaiba/index.htm</a> .....	19
<b>Figuras 8</b> – Coloração do óleo-resina de três espécies do gênero <i>Copaifera</i> da Floresta Nacional do Tapajós. (A) <i>C. paupera</i> , (B) <i>C. reticulata</i> e (C) <i>C. dukei</i> .....	21
<b>Figura 9-</b> Rota metabólica dos terpenos. Fonte – (Dewick, 2009).....	22
<b>Figura 10</b> – Sesquiterpenos e diterpenos comuns ao óleo-resina de copaíba. Fonte – (SOUSA, 2011).....	23
<b>Figura 11</b> – Local da coleta do óleo-resina - Floresta Nacional do Tapajós, Km 117. Fonte – ICMBio- <a href="http://www.icmbio.gov/flonatapajos/mapas-e-limites.html">http://www.icmbio.gov/flonatapajos/mapas-e-limites.html</a> .....	24
<b>Figura 12</b> – Coleta do óleo – Floresta Nacional do tapajós, Km 117 - Fonte – Cássio Figueira.....	25
<b>Figura 13</b> – Processo de fracionamento do óleo-resina por destilação simples. Fonte – Autora.....	25
<b>Figura 14 a 19</b> – Etapas da separação da fração volátil (FV). Fonte – Autora.....	26
<b>Figura 20 a 21</b> – Armazenamento da fração resinosa. Fonte – Autora.....	27
<b>Figura 22</b> – Cromatograma do óleo-resina de <i>C. reticulata</i> Ducke. Fonte: Autora...34	
<b>Gráfico 1</b> – Índice de citotoxicidade de OB, FR, FV na linhagem Jurkat – Leucemia T.....	36
<b>Gráfico 2</b> – Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem Nalm 6 – Leucemia B.....	36

<b>Gráfico 3</b> - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem HOS – Osteosarcoma.....	37
<b>Gráfico 4</b> - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem PC3 – Adenocarcinoma de próstata.....	37
<b>Gráfico 5</b> - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem H1299 – Carcinoma pulmonar.....	38
<b>Gráfico 6</b> - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem MCF7 – Câncer de mama.....	38

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Atividades biológicas do óleo-resina de *Copaifera* spp. ....20

**Tabela 2** – Constituintes identificados no óleo-resina de *C. reticulata* Ducke através de Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....35

**Tabela 3** – Percentual de apoptose quantificada na linhagem de células tumorais H1299 (carcinoma pulmonar).....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIPOI	Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância
DMSO	Dimetilsulfóxido
eV	Eletrovolts
FV	Fração Volátil
FR	Fração Resinosa
IC	Índice de Citotoxicidade
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Índice de Retenção
MEP	Via do Metileritritol fosfato
MEV	Via do Mevalonato
MI	Microscópio de Inversão
ml	Mililitros
MTT	Método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NI	constituintes Não Identificados
NID	Número de Identificação
OB	Óleorresina bruto
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&DBio	Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos
PX	Paclitaxel
SFB	Soro Fetal Bovino
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
UNICAMP	Universidade Estadual de São Paulo
UPA	Unidade de Produção Anual
UT	Unidade de Trabalho
VCR	Vincristina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	12
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 O CÂNCER</b> .....	12
<b>2.2 O CÂNCER NO BRASIL</b> .....	14
<b>2.3 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL FARMACOLÓGICO</b> .....	15
<b>2.4 A ÁRVORE COPAÍBA</b> .....	17
<b>2.5 A IMPORTÂNCIA DA COPAÍBA</b> .....	19
<b>2.6 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA</b> .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1 LOCAL DA COLETA</b> .....	23
<b>3.2 COLETA DO ÓLEORRESINA DE COPAÍBA</b> .....	24
<b>3.3 FRACIONAMENTO DO ÓLEORRESINA</b> .....	25
<b>3.4 SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES VOLÁTIL E RESINOSA</b> .....	26
<b>3.5 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEORRESINA</b> .....	27
<b>3.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i></b> .....	28
<b>3.6.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS</b> .....	28
<b>3.6.2 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE</b> .....	29
<b>3.6.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS</b> .....	30
<b>3.6.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS</b> .....	30
<b>3.6.5 PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS (OB, FV E FR)</b> .....	30
<b>3.6.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT</b> .....	31
<b>3.7 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	32
<b>3.8 ANÁLISE DOS DADOS</b> .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	34
<b>4.1 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEORRESINA DE <i>C. reticulata</i></b> .....	34

<b>4.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> – ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO .....</b>	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> – ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO .....</b>	<b>44</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A copaíba é uma espécie nativa da Amazônia cujo óleo tem grande importância comercial principalmente devido suas propriedades terapêuticas muito conhecidas e utilizadas na medicina popular. É uma espécie com grande potencial farmacológico e promissora na descoberta de novas atividades medicinais e produção de fármacos. O óleoresina de copaíba possui diversas atividades biológicas comprovadas, como por exemplo, antimicrobiana, anti-inflamatória, antisséptico, cicatrizante e antitumoral (PIERI et al., 2009).

Apesar de ser conhecida a eficácia desse produto, é importante a realização de estudos científicos voltados para a caracterização química do óleoresina e avaliação de sua atividade antitumoral.

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017) o câncer é a segunda causa de óbito na população nas últimas décadas, e de acordo com o cenário global de modernização e mudanças de hábitos, o número de incidências de novos casos só tende a aumentar. Isto porque além do câncer ser uma doença ocasionada por mutações genéticas espontâneas também está associada a exposição a agentes externos (físicos, químicos e biológicos).

Tendo em vista esses dados alarmantes, existe a necessidade de se encontrar novas substâncias eficazes no tratamento e combate aos diversos tipos de câncer. Substâncias com o mínimo possível de efeitos colaterais e tóxicos ao organismo. Nesse contexto, o óleoresina de copaíba que é um produto de origem natural com grande potencial biotecnológico, se torna uma alternativa promissora na descoberta de compostos que tenham potencial antitumoral.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a composição química e a atividade antitumoral *in vitro* do óleoresina de *Copaifera reticulata* Ducke proveniente da Floresta Nacional do Tapajós.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e a atividade antitumoral *in vitro* do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as frações volátil e resinosa através do fracionamento do óleo-resina coletado.
- Realizar a caracterização química do óleo-resina.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do óleo-resina de *C. reticulata* e de suas frações volátil e resinosa.
- Avaliar o efeito apoptótico do óleo-resina e de suas frações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

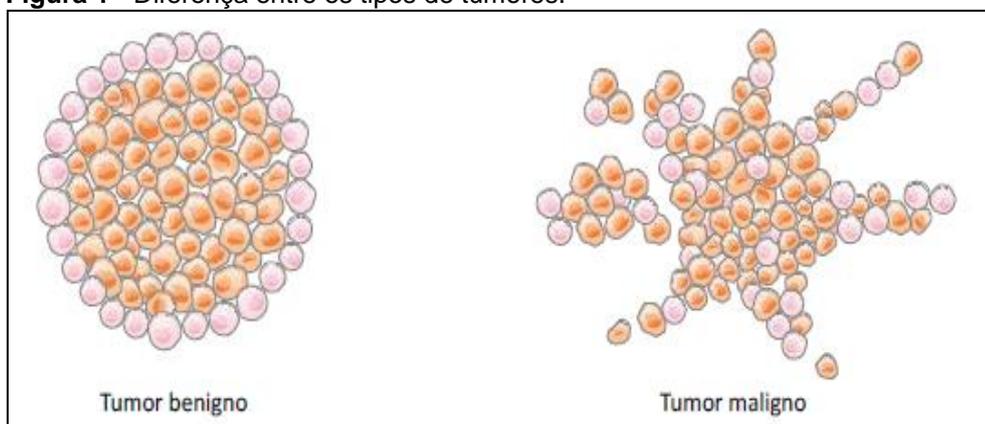
### 2.1 O CÂNCER

O câncer é uma doença genética que resulta de alterações em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. O desenvolvimento do câncer (carcinogênese) pode iniciar-se de forma espontânea ou ser causada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos) (INCA, 2008; MOURA, 2012).

As células cancerosas são aquelas que se reproduzem desobedecendo aos limites normais de divisão celular, invadindo e colonizando regiões normalmente destinadas a outras células. Desta forma, uma célula que cresce (aumento de massa) e se prolifera de forma descontrolada, originará um tumor ou neoplasia (proliferação anormal dos tecidos). O tumor é considerado benigno quando as células neoplásicas não são invasivas, caso as células desenvolvam a capacidade de invadir tecidos adjacentes o tumor passa a ser maligno, apenas nesse caso, o tumor considerado um câncer (ALBERTS et al., 2010).

As neoplasias ou tumores benignos são caracterizados por possuir um crescimento organizado, geralmente lento, expansivo e com limites bem definidos, as células são bem diferenciadas, com estrutura semelhante à do tecido que a originou, e não ocorre metástase (disseminação para outras partes do corpo). Já as neoplasias ou tumores malignos provocam metástases, podem ser resistentes ao tratamento e até levar à óbito a pessoa acometida. Esse tipo de tumor é formado por células que são diferentes das do tecido normal (anaplásicas), possuem crescimento rápido (mitoses numerosas e anormais), a massa celular é pouco delimitada, e se infiltra em tecidos adjacentes (**Fig. 1**) (INCA, 2017).

**Figura 1** - Diferença entre os tipos de tumores.



**Fonte** - Mariana F. Teles (INCA, 2017).

A classificação dos cânceres está relacionada com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os cânceres originados de células epiteliais são chamados de carcinomas. Os tumores provenientes do tecido conectivo ou de células musculares são classificados como sarcomas. Os cânceres advindos de células da linhagem branca ou de suas precursoras (células hematopoiéticas) são classificados como leucemias e linfomas (ALBERTS et al., 2010).

Na nomenclatura dos tumores benignos, acrescenta-se o sufixo – oma (tumor) ao termo que designa o tecido que os originou, como por exemplo: tumor benigno do tecido cartilaginoso (condroma), tumor benigno do tecido glandular (adenoma) (INCA, 2017).

Atualmente, os métodos terapêuticos convencionais utilizados na medicina para tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a terapia citostática e hormonal. A terapia citostática é um tratamento que impede a reprodução celular

(quimioterapia), e a terapia hormonal é utilizada contra as células que possuem dependência de hormônio (WALTER, 2012).

## **2.2 O CÂNCER NO BRASIL**

A incidência de câncer no Brasil e em todo o mundo vem apresentando um crescimento numa velocidade que acompanha o envelhecimento populacional ocasionado pelo aumento da expectativa de vida. Outros fatores que influenciam nesse crescimento, são as grandes transformações globais ocorridas nas últimas décadas que afetam a saúde da população devido a urbanização acelerada, os novos hábitos de vida e os padrões de consumo (INCA, 2008).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no Brasil para os anos de 2016/2017 estimou-se a ocorrência de 596.070 novos casos de câncer para cada um desses anos. Ainda de acordo com dados do INCA os tipos de câncer com maior incidência no Brasil, estimados para 2016/2017 (exceto pele não melanoma), para homens foram os de: próstata, traqueia, brônquio, pulmão, cólon e reto, e para mulheres são o de: mama, cólon, reto, colo do útero (INCA, 2017).

Em relação ao índice de novos casos de câncer por região do Brasil para estes dois anos, estima-se os seguintes resultados: Sudeste: 291.090 (48,8%) de novos casos, Sul: 131.880 (22,1%), Nordeste: 107.180 (18%), Centro-oeste: 44.430 (7,5%) e Norte: 21.490 (3,6%).

Dados mais atuais indicam que para os anos de 2018/2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Com exceção do câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), têm-se previstos 420 mil novos casos de câncer (INCA 2018).

Em relação aos dados sobre a incidência de câncer para homens e mulheres nesses dois anos (2018/2019), estima-se que os cânceres de próstata e de mama serão os mais frequentes, com 68 mil casos de cânceres de próstata em homens e 60 mil de mama em mulheres. Segundo dados do INCA, exceto o câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer com maior incidência em homens serão o de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral

(5,2%). Em mulheres, os cânceres destacados são o de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) (**Fig. 2**) (INCA 2018).

**Figura 2** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Brasil).

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte - (INCA, 2018).

Sobre a distribuição geográfica de casos de câncer em 2018/2019, as regiões Sul e Sudeste concentram o maior número de novos casos, cerca de 70%, com destaque para a Região Sudeste, onde estima-se quase a metade dessa incidência. Nas Regiões Sul e Sudeste, as estimativas demonstram maior incidência de cânceres de próstata, de mama feminina, cânceres de pulmão e de intestino. Os índices de câncer previstos para a Região Centro-Oeste são semelhantes aos das Regiões Sul e Sudeste, incorporando outros tipos como o câncer de colo do útero e de estômago. Nas Regiões Norte e Nordeste, também estima-se a incidência de casos de cânceres de próstata e mama feminina, além de cânceres do colo do útero e estômago, sendo que, a Região Norte é a única onde as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero são equivalentes entre as mulheres.

A partir das estimativas é possível aos serviços de saúde, desenvolver medidas preventivas de controle dessa doença, que segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) já é considerada um problema de saúde pública (INCA, 2016, 2017).

### 2.3 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Desde os primórdios da história da humanidade, as plantas são utilizadas com fins terapêuticos para obtenção da cura e do tratamento de enfermidades. Na

busca por alimentos para sua sobrevivência, a humanidade fez descobertas sobre as propriedades tóxicas ou curativas de diversas plantas. Desde então, o conhecimento etnofarmacológico obtido ao longo dos séculos, vem contribuindo para o desenvolvimento de fármacos com propriedades terapêuticas importantes, como por exemplo ácido salicílico, a atropina, a pilocarpina, o quinino, a artemisinina, o taxol, a digoxina e a morfina (ALVES, 2001; PAVANELLI & GARCIA, 2013).

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas são produzidas na natureza. As plantas são os organismos que mais se destacam na produção de metabólitos secundários, e muitas dessas substâncias sintetizadas possuem grande importância devido às suas aplicações na formulação de medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON & ANDERSON, 1969; PINTO et al., 2002).

Uma das principais funções do metabolismo secundário nas plantas é a biossíntese de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides. Essas estruturas funcionam como mecanismo de defesa contra predadores como insetos e animais herbívoros, e contra infecções por microrganismos patogênicos (ALVES, 2001).

As plantas interagem com o ambiente ao seu redor, respondendo quimicamente a estímulos físicos, químicos ou biológicos. Diversos fatores, como por exemplo, a fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, poluições atmosféricas, dentre outros, podem influenciar e até mesmo alterar a composição química dos metabólitos secundários. A produção desses metabólitos por vegetais em resposta aos estímulos ambientais, despertam bastante interesse principalmente pelo fato de grande parte dessas substâncias apresentarem atividades farmacológicas (ALVES, 2001; BARREIRO, 2001).

Muitas plantas da flora brasileira têm sido utilizadas para a cura de uma série de doenças que afetam a população. Apesar do conhecimento sobre a eficácia dessas plantas, ainda não são totalmente esclarecidos os princípios ativos, mecanismos de ação e características de citotoxicidade desses produtos (PEDREIRA, 2007).

Os produtos naturais são muito importantes como alternativa para a formulação de novos medicamentos. Nos países industrializados cerca de 45% dos fármacos são provenientes destas fontes. A utilização de plantas medicinais vem se

tornando mais frequente recebendo incentivo da própria Organização Mundial da Saúde, que incentivou os países membros que desenvolvessem pesquisas com o propósito do uso da flora com fins terapêuticos. O fator crucial que contribui no crescimento dessa prática terapêutica está relacionado ao desenvolvimento de estudos químicos e farmacológicos que comprovem a eficácia das plantas medicinais. Desta forma, as pesquisas sobre o potencial terapêutico das plantas e sua composição química tem sido alvo de diversos estudos através dos quais já foram comprovadas ações farmacológicas por meio de testes pré-clínicos e clínicos (CASTRO et al., 2004).

No Brasil, é comum a utilização de plantas medicinais, prática que vem sendo difundida de geração em geração, realizada por meio do extrativismo. A prática de utilização de plantas medicinais é cultural no país, possuindo origem na cultura de diversos grupos indígenas que habitavam o país, e nas tradições de uso dos europeus e africanos. Um exemplo de planta medicinal muito utilizada no Brasil é a *Copaifera* L. que produz um óleo conhecido popularmente como óleo de copaíba, e pode ser encontrado em feiras livres, mercados populares e farmácias de produtos naturais de todo o país (MACIEL et al., 2002).

## 2.4 A ÁRVORE COPAÍBA

Figuras 3 e 4 - Árvores de copaíba.



Fonte - Cássio Figueira.

As copaibeiras pertencem à família *Leguminosae* (subfamília *Detarioideae*), nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. São

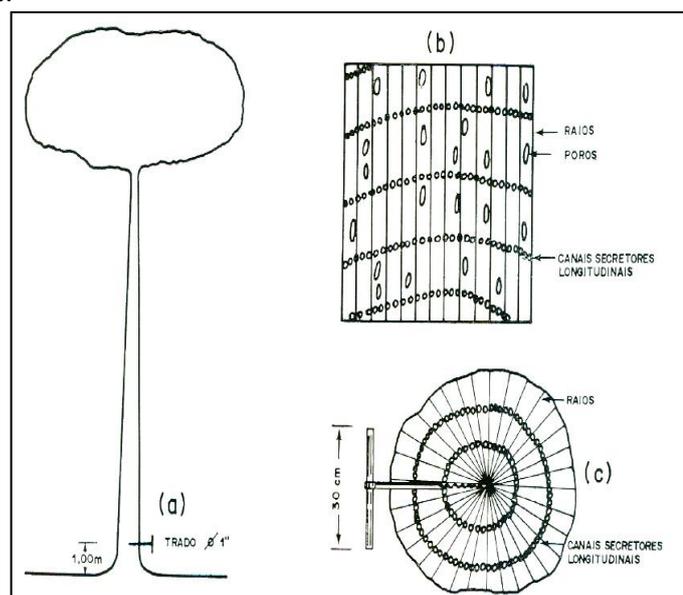
encontradas na América Latina espécies na região que se estende desde o México ao norte da Argentina. O gênero *Copaifera* apresenta aproximadamente 72 espécies catalogadas, e no Brasil ocorrem cerca de 16 espécies que estão distribuídas na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado, encontradas em ambientes de terra firme, várzea, solo arenoso, solo argiloso (AZANI et al., 2017; VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002; PINTO et al., 2010).

O Amazonas e o Pará apresentam o maior número de registro de espécies de copaíba, porém, podemos encontrar espécies deste gênero desde a floresta amazônica até o sul do Brasil. Várias espécies ocorrem especificamente em uma única região ao longo desta extensão (BARBOSA & SCUDELLER, 2009).

Foram identificadas na Amazônia brasileira cerca de nove espécies, sendo que algumas delas possuem várias morfoespécies, árvores com o mesmo nome científico, mas que apresentam características físicas diferentes recebendo, portanto, distintos nomes populares (VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002; PINTO et al., 2010).

O tronco da árvore de copaíba é áspero, de coloração escura, os canais secretores de óleo estão presentes na região cortical dos caules, dispostos de forma que se prolongam até o lenho, são abundantes e formam bolsas (SILVA et al., 2008).

**Figura 5** - (a) Perfuração; (b) Corte transversal do tronco, canais secretores longitudinais; (c) Canais secretores longitudinais.

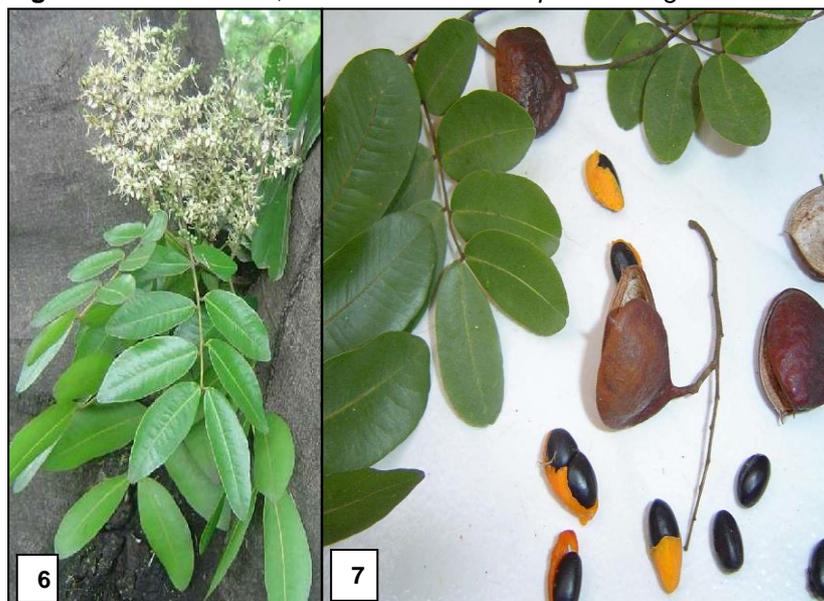


Fonte - (ALENCAR, 1982).

Quando os troncos das árvores do gênero *Copaifera* são perfurados ou cortados, é liberado um líquido, uma mistura de óleo e resina, que juntos compõem o óleo *in natura* (o óleorresina), mas é possível a separação desses compostos para usos específicos (VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002; PINTO et al., 2010).

Essas árvores são de crescimento lento, podendo viver até 400 anos. Em relação à altura podem medir aproximadamente de 25 a 40 metros, possuem casca aromática, folhagem densa, folhas alternadas, pecioladas e penuladas, flores pequenas arranjadas em panículos axilares, frutos secos, do tipo vagem monospérmica e deiscente, sementes pretas e ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos, a floração ocorre na estação chuvosa, e a frutificação no início da seca. A polinização é realizada por diversos polinizadores e a dispersão dos frutos e sementes é realizada por pássaros e outros animais (SILVA et al., 2008; ALENCAR, 1988; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).

**Figuras 6 e 7** - Flores, folhas e frutos de *Copaifera langsdorffii*.



Fonte - [www.arvores.brasil.nom.br/new/copaiba/index.htm](http://www.arvores.brasil.nom.br/new/copaiba/index.htm).

## 2.5 A IMPORTÂNCIA DA COPAÍBA

As árvores de copaíba possuem grande importância pela produção do óleorresina que é fonte de muitos compostos bioativos e amplamente utilizados principalmente pelas populações do norte e nordeste do Brasil, e também pelas indústrias farmacêuticas, devido suas propriedades terapêuticas. O óleo é um

produto de excreção e desintoxicação do organismo vegetal, e serve como mecanismo de defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006; ROMERO, 2007).

O óleoresina possui uma grande diversidade de aplicações como: diurético, xaropes, laxativo, antitetânico, antiblenorrágico, antirreumático, antisséptico, anti-inflamatório, antitussígeno, antimicrobiano, cicatrizante, antitumoral, antisséptico do aparelho urinário. Na área cosmética é utilizado na produção de cremes, sabonetes, xampus, detergentes, loções, dentre outros (MAIA et al., 2001; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006; PIERI et al., 2009).

A **Tabela 1** mostra algumas atividades biológicas atribuídas ao óleoresina de espécies do gênero *Copaifera* de acordo com diversos estudos.

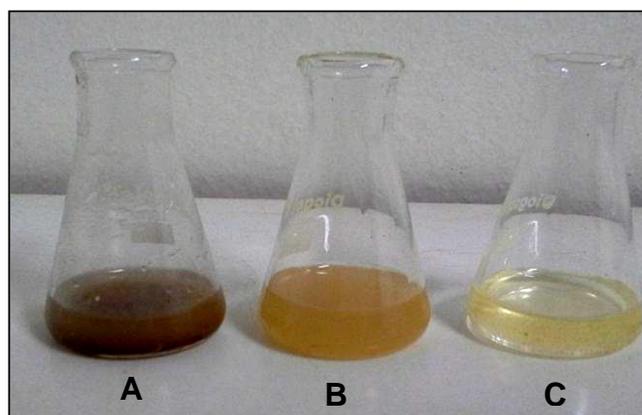
**Tabela 1** - Atividades biológicas do óleoresina de *Copaifera* spp.

<b>Propriedade Farmacológica</b>	<b>Referência</b>
Anti-inflamatória	Rio (2001); Veiga-Jr et al., (2002); Muniz (2009); Masson (2011); Lima (2015)
Antitumoral	Ohsaki et al., (1994); Pedreira (2007); Lima et al., (2003); Gomes et al., (2008); Chicaro (2009); Raniere (2015); Alencar (2016); Domingues (2017)
Antimicrobiana	Mendonça & Onofre (2009); Deus et al., (2011)
Anti-leshmaniose	Santos et al., (2008)
Antiviral	Queiroga et al., (2013); Masson (2011)
Cicatrizante	Estevão (2008)
Proliferativa	Nogueira et al., (2012); Giesbrecht (2011)

## 2.6 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

Podemos classificar o óleorresina quanto a sua coloração, turbidez e viscosidade. A coloração varia desde o amarelo-pálido até o castanho-escuro-avermelhado, do transparente ao opaco, com odor forte de cumarina e de sabor azedo a um pouco amargo, muito desagradável e persistente (**Figura 8**). O óleorresina é insolúvel em água e se dissolve parcialmente em álcool, e quando exposto ao ar ele escurece sua coloração e aumenta de viscosidade e densidade (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).

**Figura 8:** Coloração do óleorresina de três espécies do gênero *Copaifera* da Floresta Nacional do Tapajós. (A) *C. paupera*, (B) *C. reticulata* e (C) *C. dukei*.



Fonte: LIMA (2015).

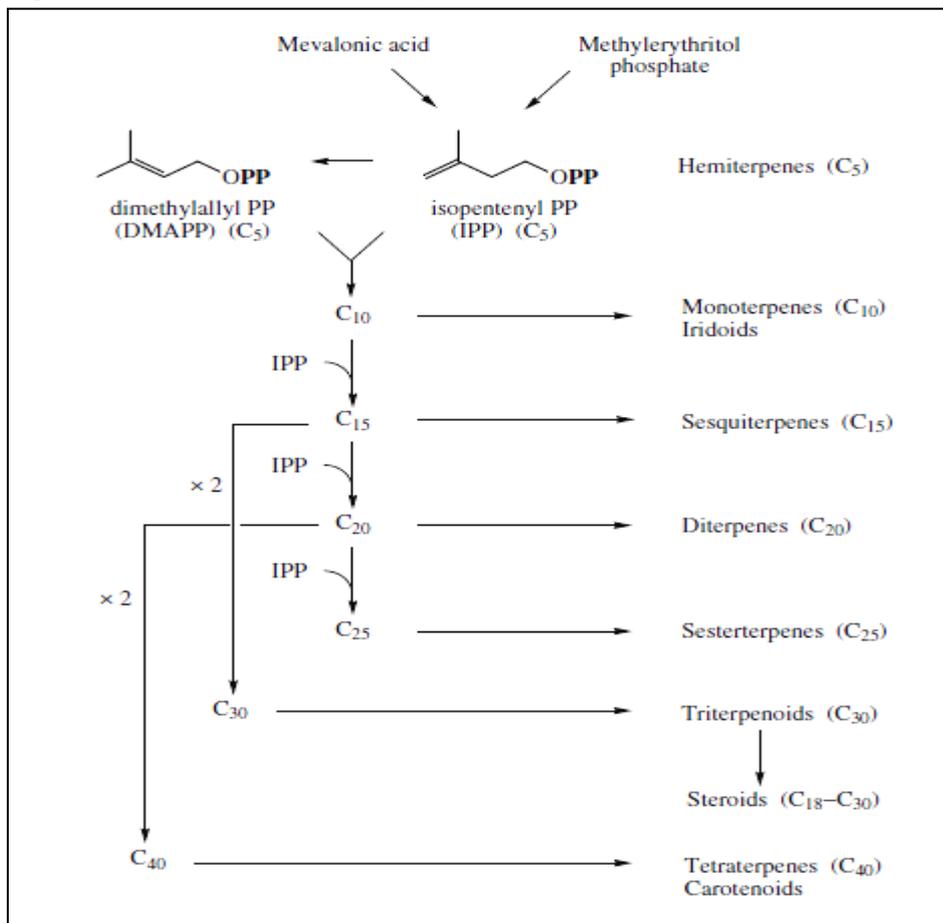
Em relação à composição química trata-se de uma solução de ácidos diterpênicos (vinte carbonos - C20), em um óleo essencial constituído por sesquiterpenos (quinze carbonos - C15) que são divididos em oxigenados e hidrocarbonetos (PIERI et al., 2009).

Os sesquiterpenos e os diterpenos são substâncias terpênicas provenientes, em sua maioria, do metabolismo secundário das plantas, e formadas por unidades de carbono C5 chamadas de isopreno. Esses compostos podem ser sintetizados em plantas superiores através de duas rotas metabólicas: a Via do Mevalonato (MEV), que ocorre no citoplasma, e a Via do Metileritritol fosfato (MEP) nos plastídeos, sendo que na maioria das plantas a rota utilizada é a do MEP. Ambas as rotas produzem as unidades de isopreno. A condensação dessas unidades C5 forma os precursores das substâncias terpênicas, no caso dos compostos do óleo de copaíba

os sesquiterpenos e diterpenos, os precursores são o farnesil difosfato (C15) e o geranylgeranyl difosfato (C20), respectivamente.

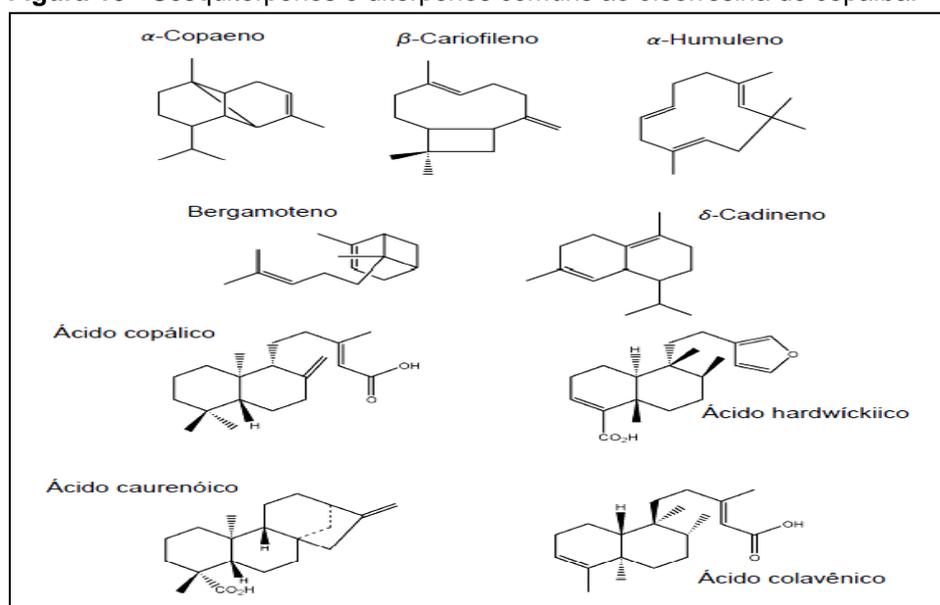
Estes precursores são transformados em terpenos através da ação de enzimas chamadas Terpeno sintases. São essas enzimas que realizam a transformação química dessas substâncias originando uma grande variedade de substâncias terpênicas com diversas funções biológicas (DEWICK, 2009; MOREIRA, 2010; NASCIMENTO, 2016).

**Figura 9** - Rota metabólica dos terpenos.



Fonte - (DEWICK, 2009).

**Figura 10** - Sesquiterpenos e diterpenos comuns ao óleo-resina de copaíba.



Fonte - (SOUSA, 2011)

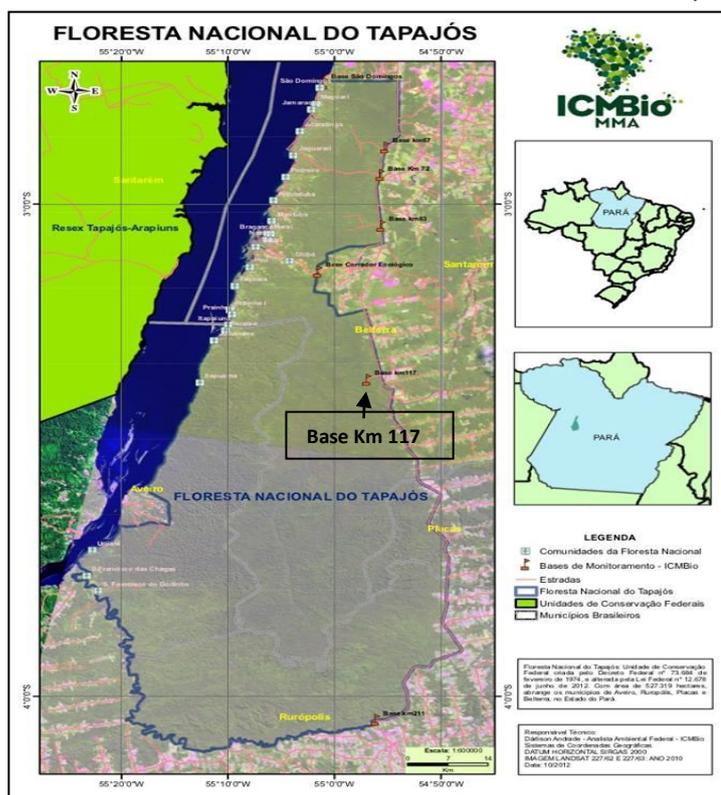
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DA COLETA

O Projeto de Pesquisa da presente dissertação foi submetido junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, obtendo-se autorização para o seu desenvolvimento na área de coleta, sob o número 45915-3.

A coleta do óleo-resina da espécie *Copaifera reticulata* Ducke foi realizada na Floresta Nacional do Tapajós no Km 117, no município de Belterra, estado do Pará (latitude S 03° 20' 43.5", longitude W 055° 01' 09.1"), no mês de maio de 2016 (período chuvoso), na UPA 10 - UT13, árvore nº 584. A identificação botânica da espécie em estudo foi realizada na Embrapa Amazônia Oriental e sua exsicata está depositada no herbário desta instituição com o número de identificação NID: 58/2016.

Figura 11 - Local da coleta do óleo-resina – Floresta Nacional do Tapajós Km 117.



Fonte - ICMBio- <http://www.icmbio.gov.br/flonatapajos/mapas-e-limites.html>.

### 3.2 COLETA DO ÓLEORRESINA DE COPAÍBA

A coleta do óleo foi realizada através da técnica descrita por OLIVEIRA et al., (2006) onde foram perfurados dois orifícios no tronco da árvore na altura de 1m e 1,50m, respectivamente, utilizando um trado tradicional de 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento. Em seguida em cada um dos orifícios foi inserido um cano do tipo PVC com  $\frac{3}{4}$  de diâmetro e 10 cm de comprimento para facilitar o escoamento e coleta do óleo. Após a coleta, os orifícios foram vedados com tampas de plástico para evitar a contaminação por microrganismo e pequenos animais, possibilitando outras coletas por meio das mesmas perfurações (OLIVEIRA et al., 2006).

A amostra de óleo-resina foi armazenada em frasco âmbar, protegido da ação da luz e do oxigênio, sendo devidamente lacrado e identificado, e em seguida transportada para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Oeste do Pará onde foi acondicionada no banco de óleos do mesmo.

**Figura 12** - Coleta do óleo – Floresta Nacional do Tapajós, Km 117.



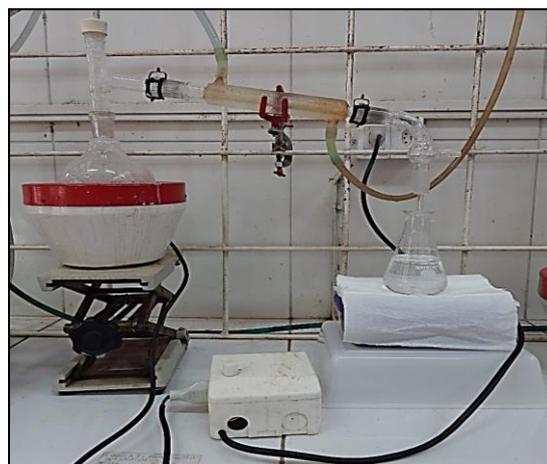
**Fonte** - Cássio Figueira.

### 3.3 FRACIONAMENTO DO OLEORRESINA

As frações volátil (FV) e resinosa (FR) do óleo-resina foram obtidas através do método de destilação simples, segundo DEUS et al., (2011), realizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos (P&DBio).

Foram adicionados 100ml do óleo-resina de *C. reticulata* em balão de fundo redondo, e adicionado 1,8L de água ultrapura. O tempo de destilação utilizado foi de 18 horas e 8min em temperatura de ebulição da água.

**Figura 13** - Processo de fracionamento do óleo-resina por destilação simples.

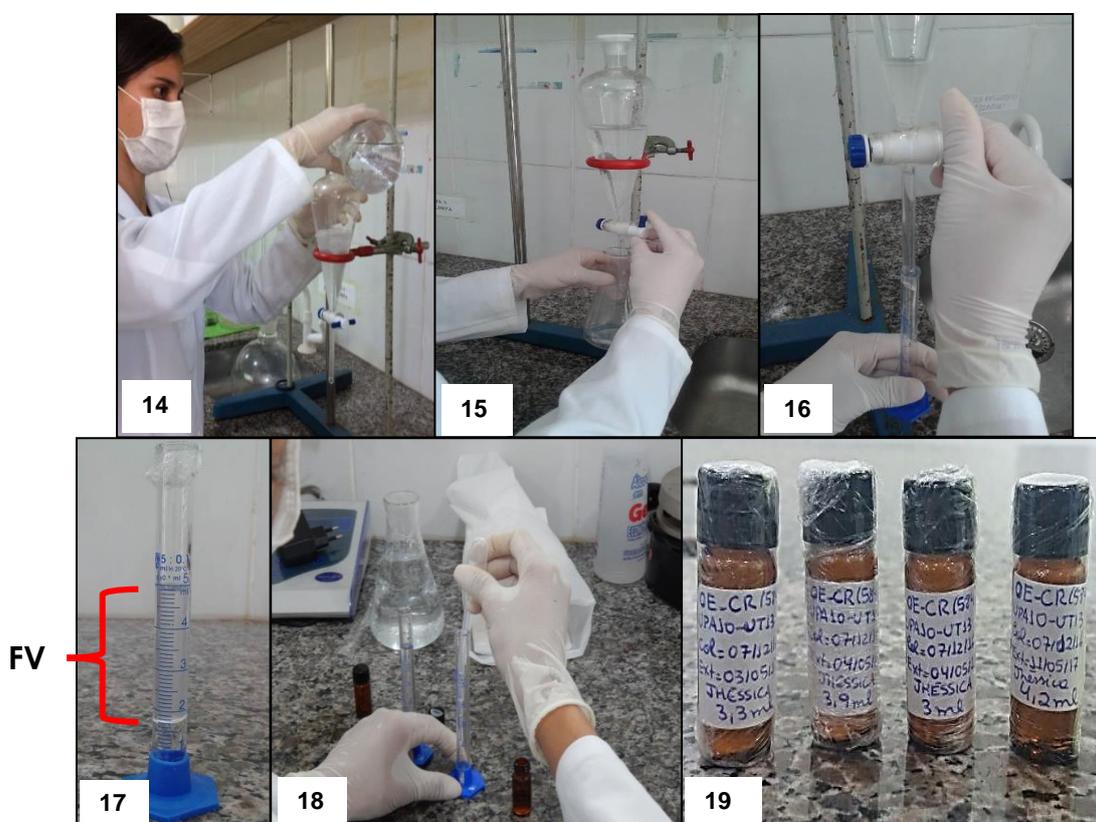


**Fonte** - Autora.

### 3.4 SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES VOLÁTIL E RESINOSA

Após o término do tempo de destilação foi realizada a separação da fração volátil do hidrolato utilizando um funil de separação. A fração volátil mais o hidrolato obtido foram inseridos no funil de separação para separação das fases. Com o auxílio de um erlenmeyer realizou-se a coleta do hidrolato e a fração volátil (FV) foi coletada em uma proveta. A fração volátil obtida foi transferida para frascos âmbar, devidamente vedados, identificados e armazenados em refrigerador (**Fig. 14 a 19**).

**Figuras 14 a 19:** Etapas da separação da fração volátil (FV).

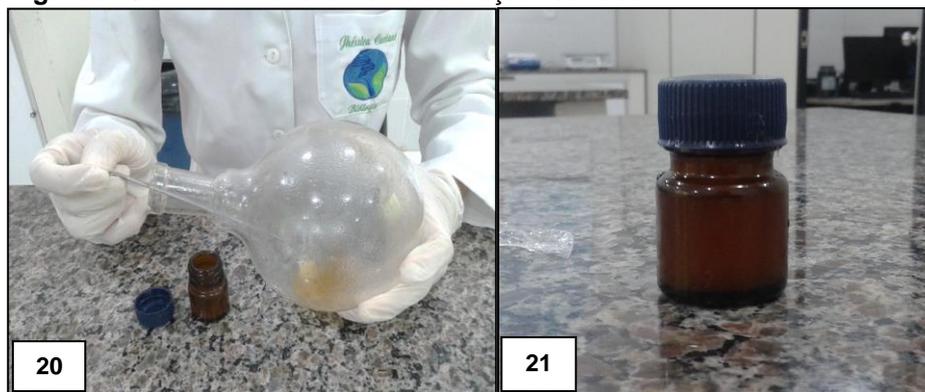


Fonte: Autora.

Para a extração da FV retida no hidrolato coletado do funil, foram adicionados 20ml de Diclorometano em cada 100ml de hidrolato. A solução foi submetida a rotaevaporação e a FV extraída coletada e armazenada em frasco âmbar.

A fração resinosa aderida no balão de fundo redondo, foi removida através do aquecimento do balão para o desprendimento da resina, e em seguida, transferida para um frasco âmbar, vedado, identificado e armazenado em refrigerador.

**Figuras 20 e 21:** Armazenamento da fração resinosa



Fonte: Autora

### 3.5 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEORRESINA

A composição química do óleo-resina de *C. reticulata* foi analisada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A análise foi realizada em cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975, coluna capilar HP5-MS (30mt x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), nas seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor: 220°C, coluna: 60°C, 3°C/min, 240°C e detector: 250°C, vazão do gás de arraste (He): 1,0 ml/min, razão de split: 1:40, detector de massas operando a 70 eV, temperatura da fonte de íons: 230°C, e temperatura do quadrupolo: 150°C.

A amostra de óleo-resina foi diluída em acetato de etila na concentração de 20 mg/ml, e um volume de 1 $\mu$ L de cada amostra foi injetado no CG-EM para análise.

Os compostos químicos foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (EM) e do Índice de retenção (IR) com os dados disponíveis na biblioteca NIST versão 2.0, no livro de ADAMS, 2007 e demais literaturas disponíveis.

## 3.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

### 3.6.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular II do Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI) - Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As linhagens de células tumorais testadas para a atividade antitumoral do oleorresina de *C. reticulata* foram: MCF7 (câncer de mama), HOS (osteosarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata) e H1299 (carcinoma pulmonar), e as linhagens leucêmicas: Nalm 6 (leucemia B) e Jurkat (leucemia T). As linhagens de células são obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e fazem parte do banco de células do Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI/UNICAMP).

As ampolas com linhagens de células leucêmicas e tumorais foram removidas dos criointainers (container de nitrogênio líquido) e descongeladas em banho-maria a 36°C. Em seguida, foram adicionados 5ml do meio de lavagem (que contém 1% de SFB) em tubos falcon de 15ml, transferiu-se cada linhagem de células para os tubos, os mesmos foram centrifugados por 10min a 1700 RPM e o sobrenadante foi descartado.

Para o cultivo das células, foram utilizados frascos para cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> e 175cm<sup>2</sup> contendo 15ml e 30ml de meio RPMI 1640, respectivamente. Após o cultivo, os frascos foram homogeneizados cuidadosamente e incubados em estufa a 37°C, saturação de CO<sub>2</sub> de 5%, por um período de 48hs, com a renovação do meio a cada 24h. No caso das células leucêmicas (não adereantes), antes da renovação do meio RPMI, os frascos de cultivo passaram por centrifugação e descarte do sobrenadante.

Finalizado o período de 48h, os frascos foram removidos da estufa e observou-se a confluência/desenvolvimento das células em microscópio de inversão (MI).

Posteriormente, foi realizada a remoção do meio de cultivo dos frascos das células tumorais e a adição de 5ml de soro fisiológico para lavagem. Após o descarte do soro adicionou-se 4ml de tripsina nos frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>, e 8ml nos frascos de 175cm<sup>2</sup>. Os mesmos foram homogeneizados e incubados em estufa a 37°C, saturação de CO<sub>2</sub> de 5% por cerca de 10min. A tripsina tem a função de

desprender as células aderidas no frasco de cultivo, fato observado com o auxílio do microscópio de inversão (MI). Pelo fato das células leucêmicas não serem células aderentes, não foi necessário realizar o procedimento descrito acima, realizou-se apenas a mensuração do volume do conteúdo contido nos frascos de cultura das mesmas.

Para a remoção da tripsina, foram inseridos 5ml de meio de lavagem nos frascos de cultivo das células tumorais, e o conteúdo das mesmas transferido para tubos falcon de 50ml e centrifugados por 10min a 1700 RPM. Após a remoção do sobrenadante, foram inseridos 5ml de meio RPMI nos tubos com as células precipitadas, seguido de homogeneização.

### **3.6.2 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

Para ambas as linhagens (tumorais e leucêmicas), um volume de células (duas gotas) foi separado em tubo cristal. Em seguida, foram adicionados 80µl de Azul de Tripán em 20µl de células. Após isso, realizou-se a contagem (estimativa) em câmara Neubauer das células coradas, utilizando o microscópio óptico, onde foram mensurados o número de células presentes nos 4 quadrantes. O número de células contabilizadas foi multiplicado pela constante de 0,125 (segundo o cálculo em câmaras de Neubauer) para se obter uma estimativa do volume de células presentes por ml x 10<sup>-6</sup>.

Utilizou-se no teste de atividade antitumoral quatro amostras: o óleo-resina bruto de copaíba (OB), a fração volátil (FV) e fração resinosa (FR) do óleo, e o controle positivo para as linhagens de células tumorais e leucêmicas: Paclitaxel (PX) e Vincristina (VCR), respectivamente, que são os fármacos geralmente utilizados para o tratamento desses tipos de câncer. O teste foi realizado em triplicata, e os tratamentos foram utilizados em sete concentrações mais o controle negativo. Foi realizado o cultivo da placa Input, células não submetidas aos tratamentos, para quantificar o número de células no tempo zero.

Para estimar o número total de poços das placas de cultivo celular que seriam necessários, multiplicou-se o número de tratamentos (quatro) pelo total de

concentrações a serem utilizadas mais o controle (oito), vezes três (triplicata), totalizando 96 poços por linhagem de células.

### **3.6.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS**

O número total de células tumorais necessárias para a realização da atividade antitumoral foi obtido considerando-se o quantitativo de 15 mil células por poço ( $0,015 \times 10^{-6}$ ), valor mínimo para que seja percebido cor no teste de MTT, num volume de 12ml. Esse valor foi multiplicado por 96 (número total de poços), resultando num total exato de  $1,8 \times 10^{-6}$  células de cada linhagem tumoral em 12 ml. A partir desse resultado, estimou-se o valor total de células para um volume de 15ml através da regra de três, quantitativo este utilizado no experimento.

### **3.6.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS**

Após obter o quantitativo de células por ml através da contagem em câmara de Neubauer, multiplicou-se o valor obtido pelo volume do conteúdo mensurado em cada frasco de cultivo após as 48h de incubação. Isso para se estimar o número total de células presentes no frasco e verificar se as células haviam se multiplicado em quantidade suficiente para a realização do experimento.

O número total de células leucêmicas necessárias para a realização da atividade antitumoral foi obtido considerando-se o quantitativo de 30 mil células por poço ( $0,03 \times 10^{-6}$ ), valor mínimo de células leucêmicas para que seja percebido cor no teste de MTT, num volume de 12ml. Esse valor foi multiplicado por 96 (número total de poços), resultando num total exato de  $3,6 \times 10^{-6}$  células de cada linhagem leucêmica em 12 ml. A partir desse resultado, estimou-se o valor total de células para um volume de 15ml através da regra de três, quantitativo este utilizado no experimento.

### **3.6.5 PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS (OB, FV E FR)**

Foram pesados 100 $\mu$ L de cada amostra, obtendo-se os seguintes resultados: óleoresina bruto (OB)= 26,8mg/ml, fração volátil 27 (FV)= 26,3mg/ml e fração resinosa (FR)= 23,7mg/ml. As amostras foram diluídas em 1ml de Dimetilsulfóxido

(DMSO) sendo que, a fração resinosa (FR) permaneceu durante 24h com o reagente antes do teste para obter maior dissolução. O volume de 224 µl de cada diluição foi adicionado em 5ml menos cada concentração do teste, de meio RPMI 1640.

### **3.6.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT**

Foram semeados 100µl de cada linhagem de células em placa de cultivo celular de 96 poços, em triplicata, bem como a placa Input (placa controle). As placas foram incubadas em estufa para cultura a 37°C, saturação de CO<sub>2</sub> de 5% durante 24hs.

As amostras OB, FV, FR, e o controle positivo (PX e VCR), foram utilizados nas seguintes concentrações finais para avaliação da atividade antitumoral: 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml e 5 µg/ml. Após a introdução das concentrações das amostras, ocorreu a incubação das placas de cultivo em estufa por 48h nas condições descritas anteriormente.

Ao final deste período, foi realizada a lavagem das linhagens de células com 200µl de soro fisiológico, sendo que, antes da inserção do soro, o meio das placas de cultivo das células aderentes foram descartados. Procedimento realizado por duas vezes. No caso das células leucêmicas, antes da lavagem com o soro fisiológico, as placas foram centrifugadas a 605 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Após a inserção do soro, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Procedimento realizado por duas vezes.

A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada através do ensaio do MTT -Método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium. Essa técnica consiste na conversão do MTT, que é uma substância hidrossolúvel e de cor amarela, em azul de formazan, através da ação da enzima succinato desidrogenase, ativa na mitocôndria de células viáveis durante o Ciclo de Krebs (BERRIDGE et al., 1996).

Através desse ensaio é possível avaliar a sobrevivência e proliferação celular, visto que apenas as células viáveis são capazes de realizar a redução do MTT (amarelo) para o formazan (azul). Desta forma, a quantidade de formazan produzido é proporcional quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983 *apud* DEGENHARDT et al., 2016; MOURA, 2012).

Após o processo de lavagem das células, foram adicionados 25µL do MTT na concentração de 5mg/ml em cada poço das placas de cultivo, seguido de incubação em estufa a 37°C, saturação de CO<sub>2</sub> de 5% durante 4 horas. Decorrido esse período, as placas foram retiradas da estufa e as células tratadas com 175µL de álcool Isopropílico (P.A – A.C.S). Passando-se o período de evaporação do álcool, foi realizada a leitura, tanto da placa controle (100% de células viáveis) quanto das placas com as linhagens tumorais e leucêmicas, em Espectrofotômetro de placa (marca Bio Tek – Power Wave XS, Software KC Júnior), com o comprimento de onda de 560nm.

### **3.7 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO**

Para quantificação de apoptose, cultivou-se 1ml de células ( $0,09 \times 10^6$  células) em cada poço da placa de cultivo de 24 poços, o mesmo foi realizado para as células do grupo controle. A quantificação de apoptose foi realizada apenas para a linhagem de célula que demonstrou maior sensibilidade aos tratamentos com o óleo-resina e suas frações. O processo de quantificação do número de células foi realizado como descrito anteriormente utilizando através da coloração com azul de tripan e contagem em câmara de Neubauer.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, saturação de CO<sub>2</sub> de 5% durante 24h. Finalizado esse período, a concentração de 0,5µg/ml de OB, FV e FR foi utilizada em cada poço, e novamente as placas incubadas em estufa.

Observou-se em microscópio de inversão (MI) a confluência/desenvolvimento das células. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e transferido para tubos cristal devidamente identificados com os códigos das linhagens. As placas foram tratadas com 1ml de soro fisiológico e novamente observadas em MI para verificar se ainda haviam células nos poços.

Os tubos cristal passaram por centrifugação a 1600 RPM durante 25 minutos, e a porção sobrenadante foi descartada.

Para análise de apoptose celular foi utilizado o Kit de detecção de apoptose (BD Pharmigen), seguindo protocolo padrão do fabricante. As células foram ressuspensas em tampão de ligação a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml. Foram transferidos 100µl da solução ( $1 \times 10^5$  células) para um tubo cristal de 5ml, e

adicionados 5µl de Anexina V FITC e 5µL Iodeto de Propídio (PI). Os tubos com as células foram agitados suavemente e incubados em estufa durante 15 min a 25°C. Adicionou-se 400µl de tampão de ligação em cada tubo e prosseguiu-se com a análise em citômetro de fluxo (excitação a 488 nm com 530 nm), da marca BD FACS Canto. A quantificação das células em apoptose foi realizada através do software Facs DIVA.

### **3.8 ANÁLISE DOS DADOS**

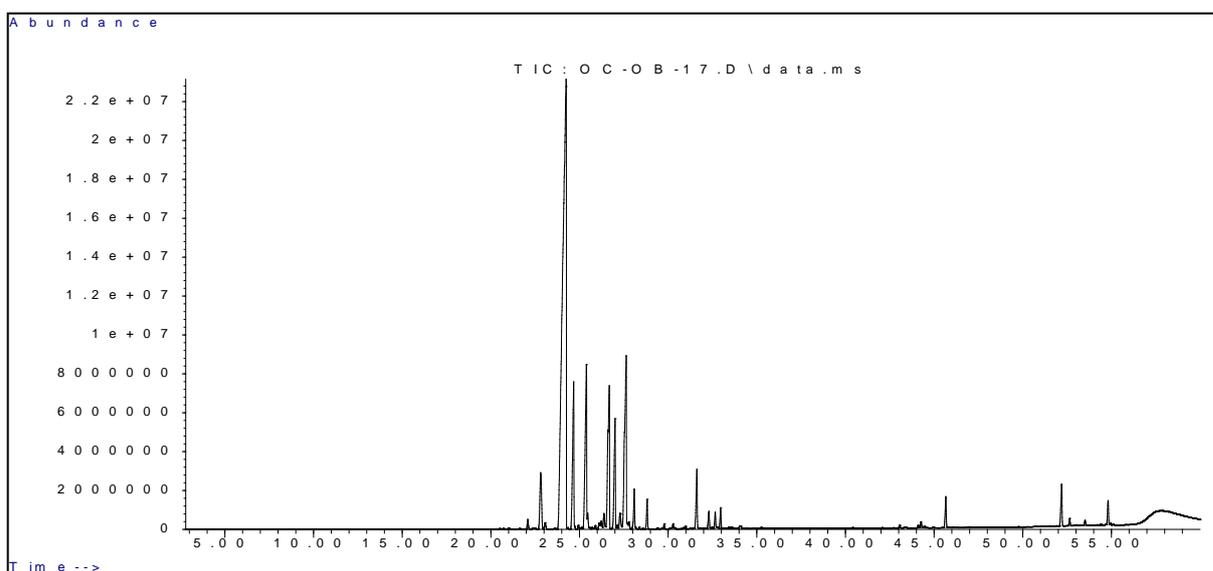
A análise estatística foi realizada segundo Amaral (2014) e Degenhardt et al., (2016), onde foi realizado o cálculo do Índice de citotoxicidade (IC50) ou concentração inibitória de 50% de viabilidade celular, através de regressão não-linear utilizando o software Origin 8.0 e os gráficos gerados pelo Software GraphPad Prism 2007.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEORRESINA DE *C. reticulata*

Na **Figura 22** podemos observar o cromatograma do óleo-resina de *C. reticulata* gerado por cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Através da análise da composição química foram identificados no total trinta e dois compostos, dos quais vinte e seis pertencem à classe dos sesquiterpenos e seis à classe dos diterpenos como demonstrado na **Tabela 2**.

**Figura 22** – Cromatograma do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke.



Fonte – Autora.

Os sesquiterpenos majoritários foram o *trans*-cariofileno (44,82%), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (5,24%),  $\alpha$ -humuleno (7,01%),  $\beta$ -selineno (6,58%),  $\alpha$ -selineno (3,75%),  $\beta$ -bisaboleno (8,57%). Dos seis diterpenos, foram identificados o 16-caureno (M = 272) e o Metil copalato (M = 318) - éster metílico do ácido copálico. Não foi possível a identificação dos demais constituintes diterpênicos, visto que, nas bibliotecas NIST, ADAMS e nas literaturas consultadas, não foram encontrados compostos com Índice de retenção (IR) e espectros de massas correspondentes.

**Tabela 2:** Constituintes identificados no óleo-resina de *C. reticulata* Ducke através de Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM).

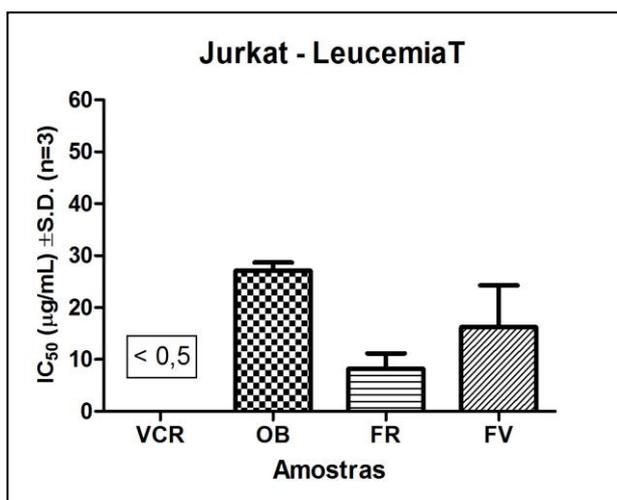
Constituintes	IR	tR (min)	Conc. relat. %
<b>Sesquiterpenos</b>			
$\alpha$ -copaeno	1373	22,085	0,30
$\beta$ -elemeno	1391	22,818	2,64
Cipereno	1397	23,060	0,25
<b><i>trans</i>-cariofileno*</b>	<b>1426</b>	<b>24,229</b>	<b>44,82</b>
<b><i>trans</i>-<math>\alpha</math>-bergamoteno*</b>	<b>1436</b>	<b>24,661</b>	<b>5,24</b>
<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	1443	24,937	0,13
<b><math>\alpha</math>-humuleno*</b>	<b>1454</b>	<b>25,379</b>	<b>7,01</b>
4,5-di- <i>epi</i> -aristolocheno	1467	25,895	0,12
$\beta$ -chamigreno	1473	26,113	0,20
Dauca-5,8-dieno	1475	26,230	0,29
NI (M=204)	1479	26,382	0,54
<b><math>\beta</math>-selineno*</b>	<b>1486</b>	<b>26,668</b>	<b>6,58</b>
<b><math>\alpha</math>-selineno*</b>	<b>1495</b>	<b>26,998</b>	<b>3,75</b>
$\alpha$ -muuroleno	1498	27,139	0,11
<i>cis</i> - $\alpha$ -bisaboleno	1502	27,291	0,68
<b><math>\beta</math>-bisaboleno*</b>	<b>1511</b>	<b>27,62</b>	<b>8,57</b>
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno	1515	27,799	0,23
$\delta$ -cadineno	1523	28,086	1,14
$\beta$ -macrocarpeno	1541	28,814	0,77
Cariolan-8-ol	1566	29,779	0,17
Óxido de cariofileno	1579	30,277	0,15
Widrol	1614	31,616	1,89
NI (M=206)	1633	32,298	0,55
$\beta$ -acorenol	1642	32,656	0,49
Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	1651	32,959	0,59
$\alpha$ - <i>epi</i> -bisabolol	1680	34,037	0,14
<b>Diterpenos</b>			
NI (M= 304)	1983	44,263	0,17
16-caureno (M = 272)	2028	45,658	0,93
NI (M=286)	-	52,189	1,36
NI (M=304)	-	52,645	0,23
Metil copalato (M = 318)	-	53,515	0,15
NI (M=304)	-	54,813	0,80
<b>Total de compostos identificados (%)</b>			<b>87,34</b>

(IR) Índice de Retenção do constituinte. (tR/min) Tempo de Retenção do constituinte na coluna do cromatógrafo dado em minutos. (Conc.relat.%) Concentração relativa percentual do composto na amostra de óleo-resina de *C. reticulata* Ducke. (\*) Constituintes majoritários (concentração > 3%). (NI) Constituinte Não Identificado. (M=) Massa molar do composto.

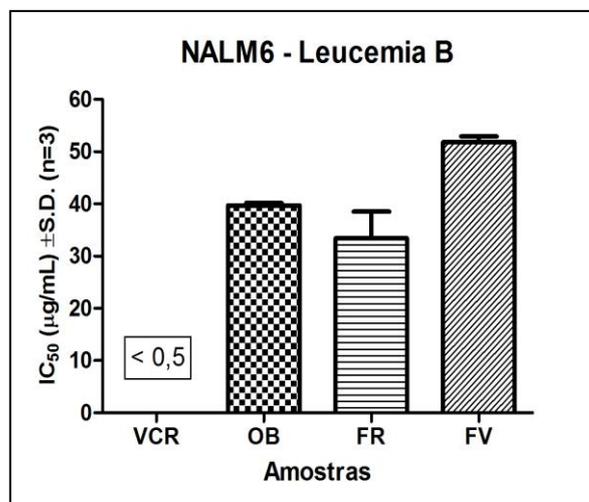
## 4.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* - ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT

O óleo-resina de *C. reticulata* Ducke e suas frações volátil e resinosa apresentaram neste trabalho, atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais MCF7 (câncer de mama), HOS (osteosarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata) e H1299 (carcinoma pulmonar), e às linhagens leucêmicas: Nalm 6 (leucemia B) e Jurkat (leucemia T). As amostras testadas apresentaram capacidade de inibir em diferentes concentrações a viabilidade das células estudadas, fato observado através da leitura da densidade óptica em Espectrofotômetro das células tratadas com o MTT. Os fármacos Vincristina (VCR) usado como controle para células leucêmicas VCR e o Paclitaxel (PX) controle para células tumorais, apresentaram IC<sub>50</sub> menor que 0,5µg/ml, surtindo desta forma, o efeito citotóxico esperado.

No **Gráfico 1** observamos o IC<sub>50</sub> (µg/ml) calculado para as amostras testadas em células Jurkat (leucemia T). A fração resinosa (FR) apresentou o IC<sub>50</sub>= 8,2 µg/ml, seguido da fração volátil (FV)= 16,2 µg/ml, e óleo-resina bruto (OB)= 27,06 µg/ml. Para a linhagem Nalm 6 (leucemia B) a fração resinosa (FR) apresentou o IC<sub>50</sub>= 33,4 µg/ml, OB(IC<sub>50</sub>)= 39,7 µg/ml e FV(IC<sub>50</sub>)= 51,8 µg/ml (**Gráfico 2**). Desta forma, as linhagens leucêmicas demonstraram mais suscetibilidade à fração resinosa (FR), que se mostrou mais citotóxica a essas linhagens dentre os tratamentos aplicados.

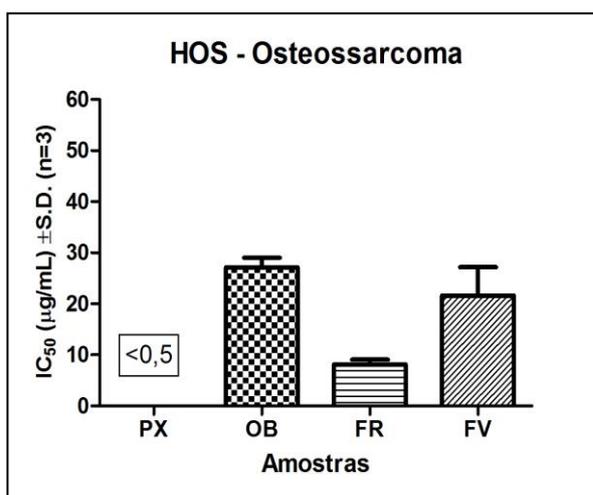


**Gráfico 1** - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem Jurkat - Leucemia T.

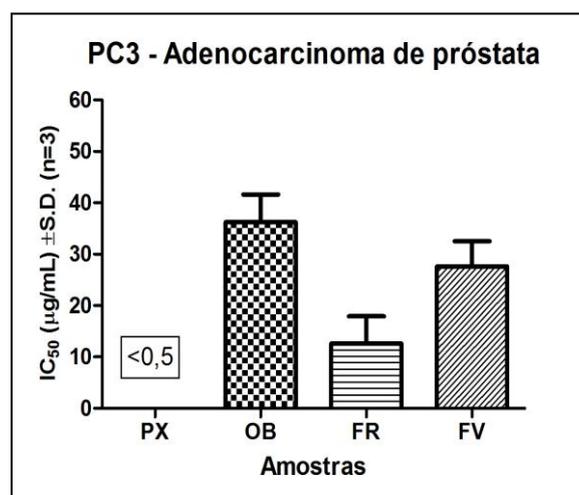


**Gráfico 2** - Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem Nalm 6 - Leucemia B.

O teste com a linhagem HOS (Osteossarcoma) a fração resinosa (FR) obteve IC50= 8,1µg/ml, seguido da FV(IC50)= 21,6 µg/ml e OB(IC50)= 27,13 µg/ml, **(Gráfico 3)**. Desta forma, observou-se que para inibir 50% da viabilidade celular da linhagem tumoral de osteossarcoma, foi necessária uma concentração da fração resinosa bem inferior em relação ao óleo-resina e sua fração volátil. Para a linhagem PC3 (adenocarcinoma de próstata) a fração resinosa (FR) também apresentou o menor IC50 dentre as amostras testadas, de 12,6 µg/ml, seguido da FV com IC50= 27,6 µg/ml e OB com o IC50= 36,2 µg/ml **(Gráfico 4)**.



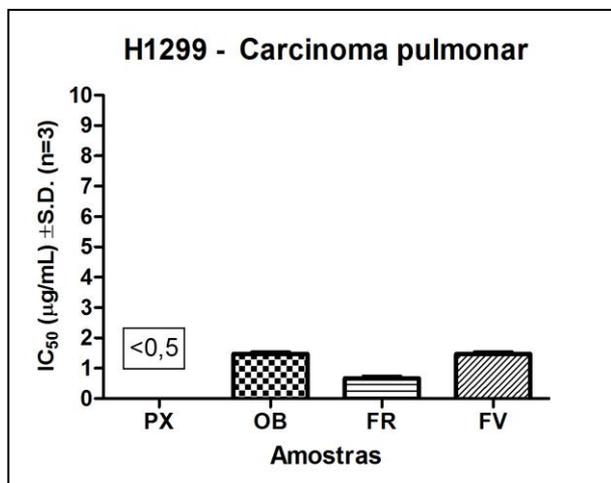
**Gráfico 3:** Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem HOS - Osteossarcoma.



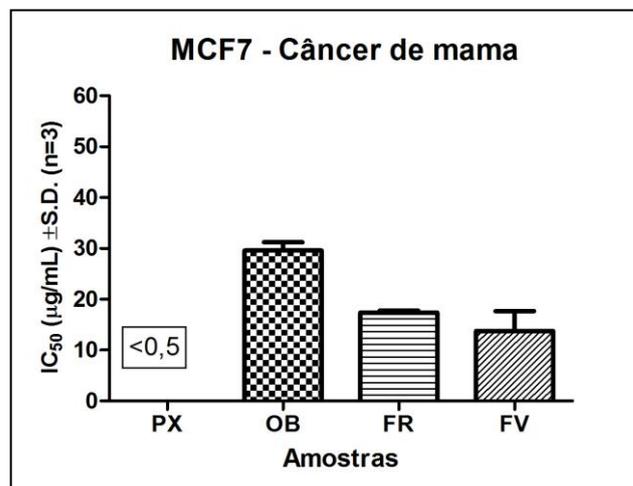
**Gráfico 4:** Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem PC3 – Adenocarcinoma de próstata.

No teste realizado com H1299 (carcinoma pulmonar) a fração resinosa novamente apresentou maior citotoxicidade à linhagem testada, com IC50 de 0,6 µg/ml. Este resultado merece destaque pois foi a menor concentração inibitória calculada no presente estudo. Significa que menos de 1 µg/ml da fração resinosa foi capaz de inviabilizar 50% das células de carcinoma pulmonar, uma concentração muito baixa se comparado aos resultados encontrados para as demais linhagens estudadas. O óleo-resina bruto e a fração volátil obtiveram ambos o IC50 de 1,46 µg/ml, um resultado também bastante inferior em relação ao IC50 das outras células cancerígenas **(Gráfico 5)**. Isso demonstra que a linhagem de células de carcinoma pulmonar (H1299) foi a mais sensível aos três tratamentos, tanto ao óleo-resina, sua fração volátil e principalmente à fração resinosa.

A linhagem MCF7 (câncer de mama) foi mais sensível à fração volátil. Esta demonstrou ser mais citotóxica, com o IC<sub>50</sub>= 13,7 µg/ml, seguida da fração resinosa com o IC<sub>50</sub>= 17,4 µg/ml e o óleorresina (OB) o IC<sub>50</sub>= 29,5 µg/ml (**Gráfico 6**).



**Gráfico 5:** Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem H1299 – Carcinoma pulmonar.



**Gráfico 6:** Índice de citotoxicidade de OB, FR e FV na linhagem MCF7 – Câncer de mama.

De acordo com os resultados obtidos (**Gráficos 1 a 5**), a fração resinosa (FR) apresentou maior citotoxicidade frente a maioria das linhagens de células cancerígenas testadas: Jurkat (leucemia T), Nalm 6 (leucemia B), HOS (osteosarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata) e principalmente à H1299 (carcinoma pulmonar). A fração resinosa (FR) obteve o menor IC<sub>50</sub> dentre os tratamentos aplicados, ou seja, em menores concentrações foi capaz de inibir 50% da viabilidade das células cancerígenas tratadas, enquanto que, OB e FV para as linhagens mencionadas, inibiram a viabilidade celular em concentrações maiores do que a FR.

Em contrapartida, a linhagem MCF7 (câncer de mama) foi mais suscetível a fração volátil (FV), que obteve o menor IC<sub>50</sub> dentre os tratamentos aplicados. Ou seja, em menor concentração da FV, 50% das células MCF7 tiveram sua proliferação inibida.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação da apoptose pode ser realizada através da utilização de iodeto de propídio ou de Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ULUKAYA et al., 2011).

A quantificação de apoptose através da citometria de fluxo foi realizada apenas na linhagem de células à qual as amostras testadas (OB, FV e FR) apresentaram maior atividade citotóxica, ou seja, menor IC50. No caso do presente trabalho foi a linhagem H1299 (carcinoma pulmonar).

A **Tabela 3** apresenta o percentual de apoptose quantificado nas células da linhagem H1299 (carcinoma pulmonar), utilizando a concentração de 0,5µg/ml de cada um dos tratamentos, concentração próxima ao menor IC50 calculado para esta linhagem no teste de citotoxicidade.

**Tabela 3:** Percentual de apoptose quantificado na linhagem de células tumorais H1299 (carcinoma pulmonar).

Concentração µg/ml	H1299 (Carcinoma pulmonar) % Apoptose		
	OB	FV	FR
[0]	0,4	0,4	0,4
[0,5]	92,5	86,1	<b>95,9</b>

Observou-se que as amostras testadas (OB, FV e FR) induziram mais de 80% das células da linhagem de carcinoma pulmonar à apoptose celular. O óleo-resina bruto (OB) induziu à morte celular de 92,5% das células, enquanto que a fração volátil (FV) induziu 86,1%. Já a fração resinosa (FR) foi a amostra que obteve a maior taxa de indução apoptótica, 95,9%.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Através da avaliação da composição química do óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram identificados trinta e dois compostos, sendo vinte e seis sesquiterpenos e seis diterpenos. Os constituintes majoritários (concentração  $\geq$  a 3%) foram o *trans*-cariofileno (44,82%), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (5,24%),  $\alpha$ -humuleno (7,01%),  $\beta$ -selineno (6,58%),  $\alpha$ -selineno (3,75%) e  $\beta$ -bisaboleno (8,57%).

O óleorresina de copaíba é composto por substâncias terpênicas provenientes do metabolismo secundário da planta, mais especificamente da classe dos sesquiterpenos, e diterpenos. Os sesquiterpenos são moléculas compostas por quinze carbonos (C15) e por isso tem como característica serem compostos voláteis, chamados de óleo essencial ou fração volátil. Os diterpenos, formados por vinte carbonos (20) constituem a porção resinosa do óleo, chamada de resina ou fração resinosa. Vários fatores influenciam na composição química do óleo, nas concentrações de sesquiterpenos e diterpenos, como por exemplo, fatores genéticos, a sazonalidade, luminosidade, nutrientes presentes no solo, e o próprio mecanismo de defesa da planta (VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; DEWICK, 2009).

No trabalho desenvolvido por Ohsaki et al., (1994) foram isolados seis clerodanos relacionados e diterpenos labdânicos do óleorresina de *Copaifera langsdorffii* Desfon., identificados como (-)-kolavenol, (+)-ácido hardwickiico, *cis*-kolavenol, *ent*-neo-4(18),13-clerodadien-15-ol, (-)-ácido copálico, 8(17),13-labdadien-15-ol, análise química realizada através de RMN (ressonância magnética nuclear).

Ao analisar a variabilidade química do óleorresina de *Copaifera* spp., Rigamonte-Azevedo et al., (2004) constataram que os componentes em maior concentração (> 1%) foram o  $\beta$ -cariofileno, observado em todos os óleos analisados,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -bisaboleno, identificados em cinco amostras,  $\beta$ -elemeno, em quatro e o  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -copaeno e  $\sigma$ -cadineno em três amostras.

Romero, 2007 realizou a análise da composição química de amostras de óleorresina de copaíba vendidos comercialmente na cidade de Campinas, e os principais terpenóides identificados foram:  $\delta$ -elemeno, biciclofelandreno;  $\alpha$ -copaeno;  $\beta$ -trans-cariofileno, humuleno,  $\gamma$ -muuroleno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -elemeno, torreyol e copalato de metila. Após o óleo ser submetido a uma extração ácido/base por cromatografia de coluna em sílica-gel, na fração neutra foram identificados o (-)- $\alpha$ -trans-bergamoteno, (-)- $\gamma$ -muuroleno, (-)- $\beta$ -trans-cariofileno, (-)- $\beta$ -bisaboleno, (-)-óxido de cariofileno, (-)-óxido de humuleno, (-)-7(11)-selinen-4-ol, (-)-torreyol e  $\alpha$ -cadinol. Na fração ácida identificou-se o ácido copálico, 3-acetoxi copálico, 3-hidróxido copálico e ent-agático, ácido hardwickiico, 7-acetoxi hardwickiico, ácido guamáico, 4 $\beta$ -hidroperoxi-18-nor-copálico e 3,19-diidroxi-copálico.

Ao comparar os constituintes do óleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer provenientes de diferentes coletas sazonais, Pinto et al., (2013) identificaram como majoritários na fração volátil o  $\beta$ -bisaboleno (34,29%; 28,17%),  $\beta$ -cariofileno (23,49%; 15,92%),  $\beta$ -selineno (7,15%; 11,39%) e  $\alpha$ -humuleno (1,03%; 1,28%) nos períodos seco e chuvoso, respectivamente.

Gonçalves (2014) identificou vinte e dois componentes do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne, sendo que os principais compostos identificados foram os sesquiterpenos cariofileno (51,64%), copaeno (8,04%), trans- $\alpha$ -bergamoteno (7,57%) e germacreno D (6,22%).

Lima (2015) analisou a composição química do óleorresina *Copaifera paupera* (HERZOG) DWYER por cromatografia gasosa de alta resolução, e constatou como componentes majoritários o  $\alpha$ -copaeno (38,55%),  $\beta$ -cariofileno (20,94%) e  $\beta$ -bisaboleno (12,37%).

## **5.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* - ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT**

Estudos *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos com o óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke e de outras espécies do gênero *Copaifera*, como os trabalhos de Raniere (2015), Ohsaki et al., (1994), Chicaro (2009) e Lima et al., (2003), dentre outros, comprovam o potencial citotóxico do óleo em diferentes linhagens de células cancerígenas. Estes estudos corroboram com os resultados do presente trabalho,

visto que tanto o óleorresina bruto de *C. reticulata* quanto as frações volátil e resinosa apresentaram em diferentes concentrações, atividade citotóxica à todas as linhagens de células testadas (tumoriais e leucêmicas), como observado nos **Gráficos 1 a 6**.

Ao avaliar os efeitos antineoplásicos do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão, Raniere (2015) constatou que o óleo de *C. reticulata* apresentou efeito antineoplásico em duas linhagens de células neoplásicas do pulmão humano, bem como na linhagem murina E9. Esses resultados confirmam os resultados obtidos no presente estudo, evidenciando o potencial citotóxico do óleorresina de *C. reticulata* frente à linhagens de células de câncer de pulmão, como podemos observar no **Gráfico 5**.

Domingues (2017) realizou o estudo do efeito antitumoral do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo, e observou que os dois tratamentos agiram como antitumorais. Nesse caso, o óleo *in natura* apresentou melhor efeito citotóxico que sua fração resina em concentração menor (0,0287µl/ml) do que para as células não cancerosas (0,3142µl/ml). Confirmando a atividade citotóxica do óleorresina bruto e sua fração resinosa em linhagem de células de câncer pulmonar. De acordo com o autor pode-se sugerir a ocorrência de sinergismo entre as frações do óleo e que ainda são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para a padronização e utilização do mesmo.

Estudos atribuem aos diterpenos, componentes da fração resinosa, a propriedade antitumoral do óleorresina de copaíba.

Ohsaki et al., (1994) realizaram o isolamento e testaram a atividade antitumoral *in vivo* de um clerodano diterpênico do óleoresina *Copaifera langsdorffii* Desfon. O composto isolado identificado como (-)-colavenol e mostrou uma potente atividade antitumoral contra o carcinoma mamário invasivo (IMC), tumor murino, em camundongos. O trabalho de Ohsaki et al., (1994) corrobora com os da presente pesquisa no que se refere a potente atividade anticancerígena dos diterpenos. Observamos no teste de citotoxicidade com as linhagens leucêmicas e tumorais que a fração resinosa foi mais citotóxica, As células de câncer de mama (MCF7) também sofreram o efeito citototóxico da fração resina, porém, a fração volátil obteve maior efeito sobre esta linhagem (**Gráfico 6**). As células de carcinoma pulmonar testadas

demonstraram maior sensibilidade a FR, pois para inibir 50% da viabilidade dessa linhagem de células foi necessária uma concentração bem inferior de FR em relação aos tratamentos OB e FV.

O óleo-resina de *C. reticulata* e de outras espécies do gênero, já foram analisados quanto sua atividade anticancerígena em outros tipos de cânceres, e também apresentaram atividade citotóxica às linhagens testadas, o que confere ao óleo um importante potencial antineoplásico bastante abrangente.

Pedreira (2007) constatou que o óleo de *Copaifera reticulata in natura* e manipulado artesanalmente, desempenham um efeito inibidor no desenvolvimento dos tumores bucais DMBA induzidos.

O óleo de *Copaifera reticulata* apresentou uma potente ação inibidora da proliferação e indução de apoptose em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal, no trabalho desenvolvido por Chicaro (2009). O óleo também desempenhou uma redução da expressão da proteína NFκB, que é responsável pela regulação de genes envolvidos nos processos de proliferação e sobrevivência celular. Esses resultados são muito positivos para o desenvolvimento de estudos que visem compreender de que forma o óleo de copaíba atua no DNA das células cancerosas, podendo assim abrir caminho para a formulação de fármacos que possam inviabilizar geneticamente o proliferação de células cancerígenas.

No trabalho desenvolvido por Alencar (2016) onde analisou o efeito *in vitro* do óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf. em células de carcinoma espinocelular (SCC 9 e SCC 25) bem como a sua associação com a radiação em carcinossarcoma de Walker 256 induzido em ratos, verificou nos resultados *in vitro* que as células cancerígenas foram mais sensíveis que as células controle frente ao óleo de copaíba nas menores concentrações (0,5mg/ml; 1mg/ml; 5mg/ml), e que na concentração de 10mg/ml, o óleo de copaíba mostrou-se tóxico tanto para as células controle, quanto para as células cancerígenas.

Lima et al., (2003) ao realizar estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a atividade anticancerígena de *Copaifera multijuga* Hayne, constatou que o óleo-resina e suas frações diterpênica, sesquiterpênica e o óleo-resina reconstituído, apresentaram atividade antitumoral na linhagem de melanoma nos modelos *in vivo* e *in vitro*. O óleo-resina inibiu em 58% o crescimento do tumor sólido com redução de 76% no peso do tumor. Observaram também uma redução significativa no número de

nódulos no pulmão em relação ao grupo controle. No teste *in vitro* constatou-se que a redução da viabilidade celular é diretamente proporcional ao tempo de incubação. Nas concentrações de 0,5 e 1 mg/ml do óleoresina, com 3 horas de incubação, a viabilidade celular redziu para  $34,0\% \pm 9,1\%$  e  $16,8\% \pm 7,9\%$  respectivamente, em relação ao grupo controle ( $110,9\% \pm 16,7\%$ ). Durante 1 hora de incubação utilizando a concentração de 1 mg/ml, os percentuais de viabilidade celular foram de  $43,4\% \pm 7,9\%$  para fração diterpênica,  $47,0\% \pm 18,6\%$  para fração sesquiterpênica e  $35,0\% \pm 9,8\%$  para o óleoresina reconstituído a partir das frações.

A propriedade antineoplásica do óleo de *Copaifera multijuga* e das frações clorofórmica e hexânica foi comprovada por Gomes, et al., (2008) em doses variando entre 100 e 200 mg/Kg contra tumor ascítico de Ehrlich (EAT) e tumor sólido. Foram observadas a inibição do número de células ascíticas tumorais e a revesão da contagem de medula e de células sanguíneas para valores semelhantes ao grupo controle. Vários mediadores inflamatórios como proteína total, PGE2, óxido nítrico e TNF no líquido ascítico também tiveram seu aumento inibido.

Ainda são poucos os trabalhos sobre a citotoxicidade da fração resinosa do óleoresina de copaíba. Provavelmente pela dificuldade em se trabalhar com essa porção do óleo, pois a separação da resina é de certa forma demorada e trabalhosa, por tratar-se de uma resina (ácido graxo) de difícil dissolução, e pela dificuldade em identificar os constituintes químicos, visto que, não existe uma literatura específica para identificação dos mesmos. Desta forma, são mais comuns trabalhos realizados com o óleoresina bruto e sua a fração volátil (óleo essencial).

### **5.3 QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE – CITOMETRIA DE FLUXO**

A apoptose é a morte celular programada. Nas células, esse processo fisiológico desencadeia várias alterações morfológicas e bioquímicas que culminam na morte celular. A apoptose é um processo fundamental para o controle da quantidade e dos diferentes tipos de células, eliminando as células envelhecidas, as que possuem alguma alteração inclusive genética, e as que representam algum prejuízo para o organismo (SILVA, 2014).

A apoptose contribui para a regulação da homeostase, pois o crescimento tecidual seja ele normal ou maligno resulta do equilíbrio de fatores como a

proliferação e destruição das células. Alterações na regulação da apoptose podem contribuir para o surgimento de doenças como as autoimunes e neoplásicas (KERR et al., 1972; YUAN et al., 2012)

Os diferentes tipos de câncer possuem características muito distintas, porém, sabe-se que todos os tumores malignos adquiriram a capacidade de se proliferar de forma descontrolada, desobedecendo os limites impostos às células normais. A multiplicação de uma célula com alterações genéticas, está associado ao desequilíbrio da sua capacidade proliferativa e também em consequência da incapacidade de morrer por apoptose. Desta forma, apesar da diversidade em tipos de câncer, pesquisas científicas vêm demonstrando que a principal característica comum à maioria dos tumores malignos é a resistência à apoptose (OKADA & MAK, 2004).

Tendo em vista a importância da apoptose no processo de carcinogênese, o presente trabalho apresentou resultados interessantes em relação a taxa de apoptose na linhagem de células tumoral testada, a H1299 (carcinoma pulmonar).

De acordo com a quantificação da apoptose por citometria de fluxo, o óleo-resina bruto, e suas frações volátil e resinosa, induziram mais de 80% das células da linhagem H1299 à morte celular, utilizando uma concentração de 0,5µg/ml das amostras.

A fração resinosa (FR) se destacou ao induzir mais de 95% das células ao processo de apoptose celular, ou seja, quase que a totalidade de células testadas.

No trabalho realizado por Domingues (2017), onde avaliou a taxa de apoptose por fluorescência com Laranja de Acridina e brometo de etídio, do óleo *in natura* de *Copaifera reticulata* Ducke e de sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo, observou que ambos os tratamentos apresentaram atividade apoptótica à linhagem testada, porém, o óleo *in natura* apresentou maior atividade apoptótica em relação a resina, sendo que a resina se mostrou mais citotóxica às células normais do que o óleo *in natura*. O autor atribui o melhor resultado de apoptose ao óleo *in natura*, devido a um provável efeito sinérgico entre as frações sesquiterpênicas e diterpênicas.

Ao analisar o efeito apoptótico por análise de fluorescência, com Laranja de Acridina e brometo de etídio, do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão humano, Ranieri (2015) observou que as

concentrações do óleo testadas (0,16µg/ml, 0,32 µg/ml e 0,64 µg/ml) induziram à morte celular a linhagem de células cancerosas, com destaque para a concentração 0,64 µg/ml que induziu à apoptose acima de 80% das células.

São poucos os estudos que visam analisar o efeito apoptótico do óleo-resina de espécies do gênero *Copaifera*, especificamente da espécie em estudo no presente trabalho, a *C. reticulata* Ducke. É necessário, portanto, a realização de mais estudos sobre o potencial apoptótico do óleo-resina de copaíba, para somar aos resultados da análise de citotoxicidade realizadas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo-resina de *C. reticulata* Ducke apresentou composição química característica do gênero *Copaifera*, sendo uma mistura de constituintes sesquiterpênicos e diterpênicos.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam o potencial anticancerígeno do óleo-resina de copaíba, mais especificamente da espécie *Copaifera reticulata* Ducke. Os achados são promissores no que diz respeito a utilização do grande potencial biológico deste produto natural para a formulação de fármacos que combatam diversos tipos de cânceres.

Estudos mais aprofundados testando a atividade citotóxica do óleo-resina de *C. reticulata* e suas frações em outras concentrações ainda precisam ser realizados para se encontrar uma concentração ainda menor dos tratamentos que seja capaz de inibir a proliferação celular de células cancerígenas (IC50), sem ser tóxica para células saudáveis.

Após os testes de citotoxicidade *in vitro* é importante futuramente a realização de testes *in vivo*, com camundongos infectados com linhagens de células cancerígenas, para se observar como os organismos reagem ao tratamento com óleo-resina bruto e suas frações volátil e resinosa. Desta forma será possível comparar os resultados *in vitro* e *in vivo*, saber quais os efeitos fisiológicos desempenhados pelos tratamentos, e se os mesmos são tóxicos aos indivíduos testados.

O isolamento dos compostos sesquiterpênicos e diterpênicos presentes no óleo-resina de *C. reticulata* é imprescindível para posteriores estudos sobre a atividade antineoplásica desses constituintes isoladamente, afim de verificar a qual deles é atribuído o efeito citotóxico, ou se, o efeito ocorre em decorrência de sinergismo.

É importante investigar quais os mecanismos de ação que o óleo-resina bruto de *C. reticulata* e suas frações volátil e resinosa utilizam para surtirem os efeitos citotóxico e apoptótico sobre células cancerígenas de linhagens tumorais e leucêmicas.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam ainda mais a importância do óleo-resina de copaíba proveniente da região Amazônica como fitoterápico natural

com potencial anticancerígeno, sendo desta forma, uma fonte promissora para a elaboração de novos fármacos antineoplásicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Componentes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4th Edition. ISBN 978-1-932633-21-4, 2007.

ALBERTS, Bruce.; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. 1396 p.; il.;, 2010.

ALENCAR, Jurandyr da Cruz. **Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia central. IV. Interpretação de dados fenológicos em relação a elementos climáticos**. Acta Amazônica, V. 18 (3-4): p.199-209, 1988.

ALENCAR, P. N. B. **Efeito do óleo de copaíba associado à radiação no tratamento de carcinossarcoma induzido em ratos**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

ALVES, Hélio de Matos. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos**. Cadernos temáticos da Química Nova na Escola, Vol. 3, 10-15, 2001.

AMARAL, Ricardo Guimarães. **Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha x villosa* (Lamiaceae)**, 2014, 74 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

AZANI, Nasim; BABINEAU, Marielle; BAILEY, C. Donovan; BANKS, Hannah; BARBOSA, Ariane R.; PINTO, Rafael Barbosa; BOATWRIGHT, James S. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny**. TAXON 66 (1). February 2017: 44–77. [https:// doi.org/10.12705/661.3](https://doi.org/10.12705/661.3).

BARBOSA, Karol de Souza.; SCUDELLER, Veridiana Vizoni. Distribuição das espécies do gênero *Copaifera* L. na Amazônia Legal e aspectos morfológicos de *C. multijuga* Hayne da Reserva de Desenvolvimento do Tupé, Manaus-AM. In: **Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo do Rio Negro, Amazônia Central**. V. 2 Cap.11. UEA Edições, Manaus, 2009.

BARREIRO, Eliezer J. **Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos**. Cadernos temáticos da Química Nova na Escola. Vol. 3, 4-9, 2001.

BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S.; MCCOY, Kathy D.; WANG, Rui. **The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts**. Biochemica, n.º. 4. 1996

CASTRO, Henrique Guilhon de.; FERREIRA, Francisco Affonso; SILVA, Derly José Henriques da.; MOSQUIM, Paulo Roberto. **Contribuição ao Estudo das Plantas**

**Medicinais - Metabólitos Secundários.** 2ª ed. Visconde do Rio Branco: s.n, 113p.: il.; 22cm. 2004.

CHICARO, C. F. **Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de copaíba e andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 126.:fig., tab., graf.; 30 cm. São Paulo, 2009.

DEGENHARDT, Ruth T.; FARIAS, Ingrid V.; GRASSIA, Liliane T.; FRANCHI, Gilberto C. Jr.; NOWILL, Alexandre E.; BITTENCOURT, Christiane M. da S.; WAGNER, Theodoro M.; SOUZA, Márcia M. de.; CRUZ, Alexandre Bella.; MALHEIROS, Angela. **Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 26, p. 56–61, 2016.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. **Avaliação do efeito antifúngico do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne).** Revista Brasileira Pl. Med., Botucatu, v.13, n.1, p.1-7, 2011.

DEWICK, Paul. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach.** 3ªrd ed. P. cm. Wiley & Sons Ltd. ISBN: 978-0-470-74168-9, 2009.

DOMINGUES, P. S. **Estudo do efeito antitumoral do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. São Paulo, 118 f. 2017.

ESTEVIÃO, Ligia Reis de Moura. **Aspectos morfológicos e morfométricos de retalhos cutâneos em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*).** Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 54p.; Recife, 2008.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. de M.; FONTES, S. P.; HOVELL, A. M. C.; LANDGRAF, R. G.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. da. C.; FERNANDES, P. D. **Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor.** Journal of Ethnopharmacology 119. 179–184, 2008.

GONÇALVES, Eduardo da Silva. **Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (*Fabaceae*).** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 140 f: il.; 30 cm. 2014.

GIESBRECHT, Patrícia Caldeira Penna. **Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato.** Dissertação (Mestrado) – Ciência Animal, Centro Universitário Vila Velha, Espírito Santo, 61p.: 2011.

ICMBio- MMA- Floresta Nacional do Tapajós. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/flonatapajos/mapas-e-limites.html>> Acesso em: 02 junh. 2016.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (Brasil). **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 3ª ed. Rio de Janeiro, Ver. Atual. Ampl. 628 p.: il. color. tab.; 29cm. INCA, 2008.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Organização Mario Jorge Sobreira da Silva. ABC do Câncer – **Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 3ª ed. Rio de Janeiro, Revista e atualizada. 108 p. ISBN 978-85-7318-316-0 (versão eletrônica), 2017.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil /** Coordenação de Prevenção e Vigilância. – 128 p.: il. color. ISBN 978-85-7318-361-0. Rio de Janeiro, 2018.

KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURIE, A. R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics**. Br. J. Cancer. Vol.26:239-257, 1972.

LIMA, Helen Soares. **Potencial anti-inflamatório da oleoresina de *Copaifera paupera* (HERZOG) Dwyer – Leguminosae**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém-PA, 2015.

LIMA, Sylvia R. M.; VEIGA-JUNIOR, Valdir F.; CHRISTO, Herick B.; PINTO, Angelo C.; FERNANDES, Patrícia D. **In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions**. Phytotherapy Research. v.17, p. 1048–1053, 2003.

MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; VEIGA-JR., Valdir. F.; GRYNBERG, Noema F.; ECHEVARRIA, Aurea. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MAIA, José Guilherme Soares; ZOGHBI, Maria das Graças Bichara; ANDRADE, Eloisa Helena de Aguiar. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém/PA: Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke, 2001.

MASSON, Daniela dos Santos. **Atividade cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. Tese (Doutorado) – Ciências Médicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 215f.: il.; 30cm. Ribeirão Preto, 2011.

MENDONÇA, Davidy Eduardo; ONOFRE, Sideney Becker. **Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga***

Hayne (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy* - 19(2B): 577-581, Abr./Jun. 2009.

MOREIRA, Laura Silveira Drummond. **Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)** (Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae), 2010, 80 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* v.65, p. 55–63, 1983. *apud* DEGENHARDT, Ruth T.; FARIAS, Ingrid V.; GRASSIA, Liliane T.; FRANCHI, Gilberto C. Jr.; NOWILL, Alexandre E.; BITTENCOURT, Christiane M. da S.; WAGNER, Theodoro M.; SOUZA, Márcia M. de.; CRUZ, Alexandre Bella.; MALHEIROS, Angela. **Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides***. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, p. 56–61, 2016.

MOURA, Ana Paula Gomes. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil**, 2012, 117 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa PB. 2012.

MUNIZ, José Wagner Cavalcante. **Estudo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará. 137p.: Belém, 2009.

NASCIMENTO, César Augusto. **Caracterização funcional de terpeno sintases de citros**, 2016, 49 f. 2 Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo, 2016.

NOGUEIRA, Edson de Oliveira; NOVAES, Adriano Sodré Magalhães; SANCHEZ, Camila Maria Sene; ANDRADE, Cláudio de Moraes; SILVA, Marta Fernanda Albuquerque da. **Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) na proliferação celular *in vitro***. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012

OHSAKI, Ayumi; YAN, Lu Tong; ITO, Shigeru; EDATSUGI, Hajime; IWATA, Daiji; KOMODA, Yasuo. **The isolation and in vivo potente antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 24, pp. 2889-2892, 1994.

OKADA, Hitoshi; MAK, Tak W. **Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells**. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4:592-603.

OLIVEIRA, Elaine Cristina Pacheco; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, Maria das Graças Bichara. **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.

PAVANELLI, Mariana Felgueira.; GARCIA, Roberto. **Avaliação antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de quatro espécies vegetais.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.8, n.3, p.26-31, ago./dez. ISSN:1980-0002. 2013.

PEDREIRA, Erick Nelo. **Avaliação do efeito inibidor do óleo resina de copaíba *in natura* (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida,** 2007, 169 f. Dissertação (Doutorado) – Doutorado em Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, 2007.

PHILLIPSON, J. David; ANDERSON, Linda A. **Ethnopharmacology and western medicine.** Journal of Ethnopharmacology, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. Vol. 25, 61- 72, 1969.

PIERI, Fábio Alessandro; MUSSI, Maria Carolina; MOREIRA, Maria Aparecida S. **Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PINTO. Andréia; AMARAL, Paulo; GAIA, Carolina; OLIVEIRA, Wanderléia de. **Boas práticas para o manejo florestal e agroindustrial de produtos florestais não madeireiros: açaí, andiroba, babaçu, castanha-do-Brasil, copaíba e unha-de-gato.** Belém-PA: Imazon; Manaus AM: Sebrae- AM, 2010.

PINTO, Ângelo C.; SILVA, Dulce Helena Siqueira; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Norberto Peporine; EPIFANIO, Rosângela de Almeida. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

PINTO, I. F.; OLIVEIRA, E. C. P.; OLIVEIRA, R. C.; REBELO, S.; SILVA, A. S. **Composição química do óleo-resina de *Copaifera duckei* Dwyer proveniente de coletas sazonais da Floresta Nacional do Tapajós, PA.** Anais do VII SBOE – Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. ISBN – 978-85-66836-05-9. 2013.

QUEIROGA, Carmen Lucia; GONÇALVES, Paulo Vitor; SARTORATTO, Adilson; KONECNY, Luciana; OLIVEIRA, Elaine Cristina Pacheco de; ARNS, Clarice Weis; BARATA, Lauro E. S. **Avaliação da atividade antiviral e dos constituintes voláteis do óleo-resina de copaiba.** Anais do VII SBOE – Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Universidade Federal do Oeste do Pará –ISBN – 978-85-66836-05-9, 2013.

RANIERI, T. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental Comparada – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 63 p. 2015.

RIGAMONTE-AZEVEDO, Onofra Cleuza; WADT, Paulo Guilherme Salvador; WADT, Lúcia Helena de Oliveira. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Documento 91. EMBRAPA: Rio Branco, Acre, 2004.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; REGIANI, A. M. **Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da Amazônia brasileira**. Rev. bras. ol. fibros., Campina Grande, v.8, n.2/3, p.851-861, maio-dez. 2004.

RIGAMONTE-AZEVEDO, Onofra Cleuza.; WADT, Paulo Guilherme Salvador; WADT, Lúcia Helena de Oliveira. **Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia**. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.583-591, 2006.

RIO, Ricardo Gomide Woisky do. Atividade anti-inflamatória, toxicidade e aspectos químicos do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e de suas respectivas frações. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 130p.:. São Paulo, 2001.

ROMERO. Adriano Lopes. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. Dissertação (Mestrado) – Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química. 222 f. Campinas – SP, 2007.

SANTOS, Adriana O.; UEDA-NAKAMURA, Tânia; DIAS-FILHO, Benedito P.; VEIGA-JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Ângelo C.; NAKAMURA, Celso Vataru. **Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis***. Journal of Ethnopharmacology 120, 204–208, 2008.

SILVA, Ana Paula Silvério. **Importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas. Metodologias usadas e novos fármacos**. Dissertação (Mestrado) Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 85p., Lisboa-Portugal, 2014.

SILVA, Regina C. V. Martins da; PEREIRA, Jorge Fontenella; LIMA, Haroldo Cavalcante de. **O Gênero *Copaifera* (Leguminosae-Cesalpinoideae) na Amazônia Brasileira**. Rodriguésia, v. 59, n. 3, p. 45-476, 2008.

SOUSA, João Paulo Barreto. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**. Tese (Doutorado) – Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto – São Paulo, 179 p.; 30cm. 2011.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; ARI, F.; IKITIMUR, E.; YILMAZ, Y. A. **Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively**. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]. V.36(3): 261 – 9, 2011.

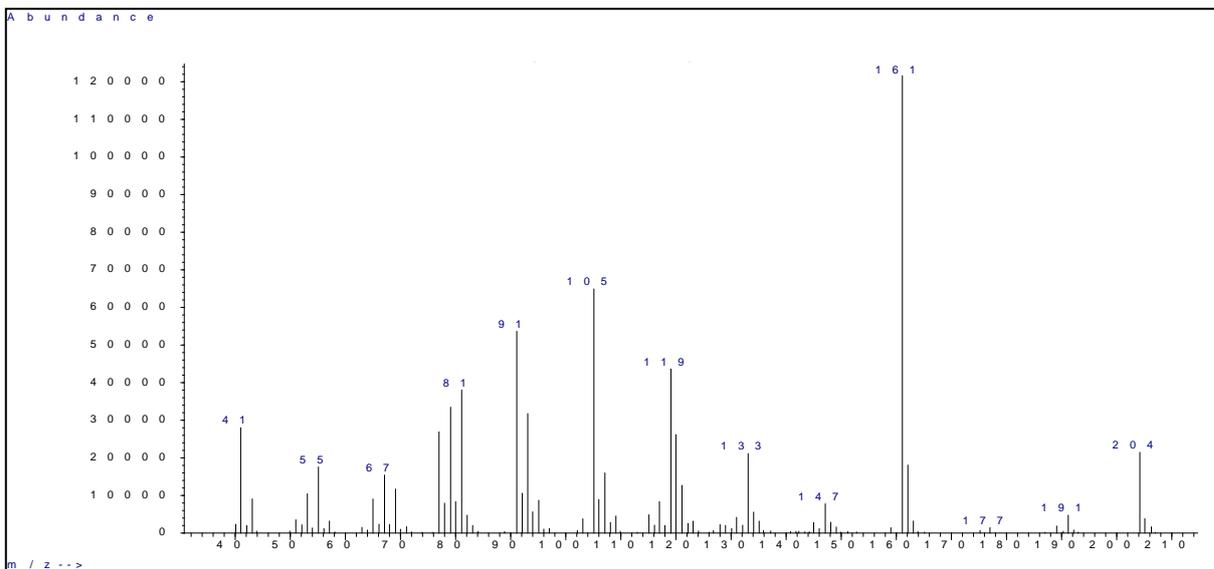
VEIGA JÚNIOR, Valdir F. & PINTO, Angelo C. **O gênero** *Copaifera* L. Química. Nova, v. 25. n. 2, p. 273-286, 2002.

WALTER, Walter. **Esperança contra o câncer: a mente ajuda o corpo**. Tradução Paola Schmid; Fernanda Romero, São Paulo, Editora Europa ISBN 978-85-7960-121-7, 2012.

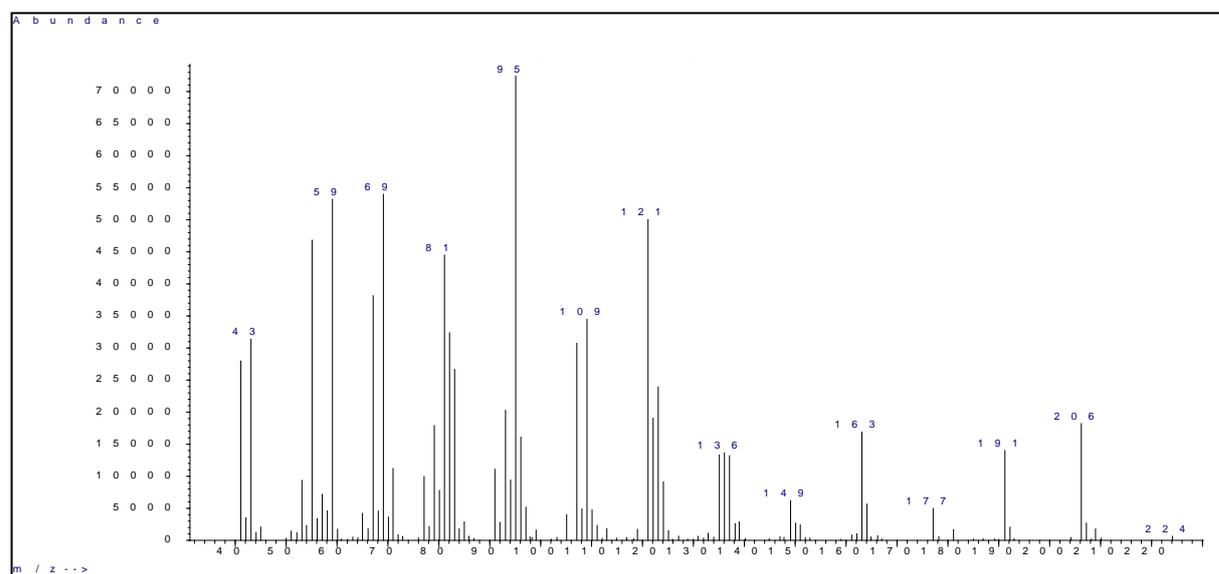
YUAN, Chung-Hsiang; FILIPPOVA, Maria; DUERKSEN-HUGHES, Penelope. **Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy**. *Viruses*. v.4, 3831-3850; doi:10.3390/v4123831. ISSN 1999-4915. 2012.

## 8 ANEXOS

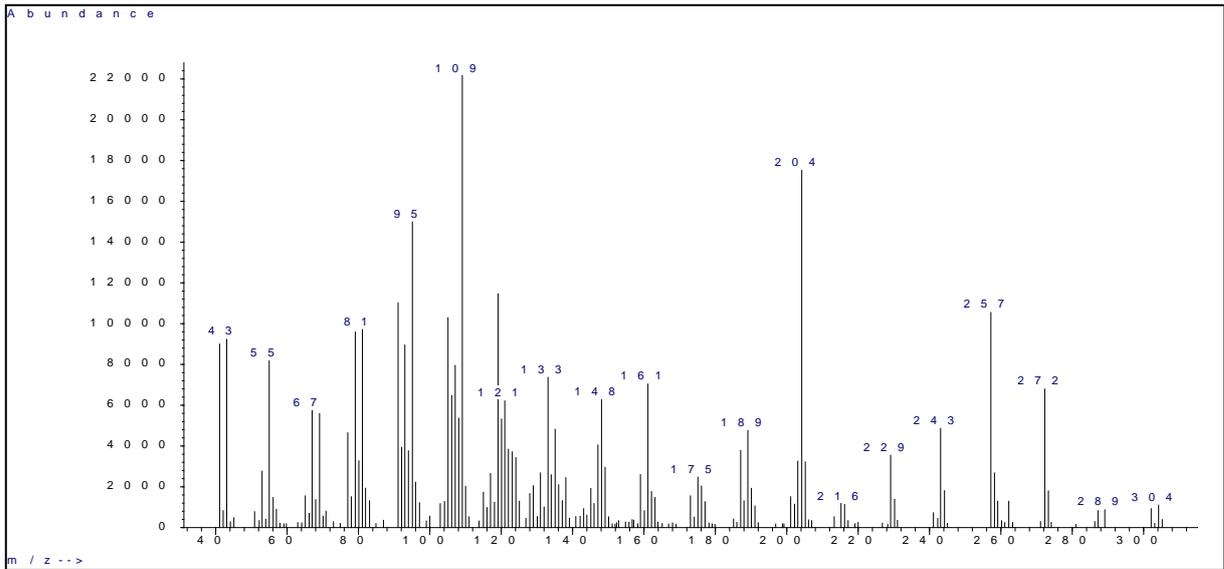
### Espectros de Massas dos constituintes Não Identificados (NI) no óleo-resina de *C. reticulata* Ducke.



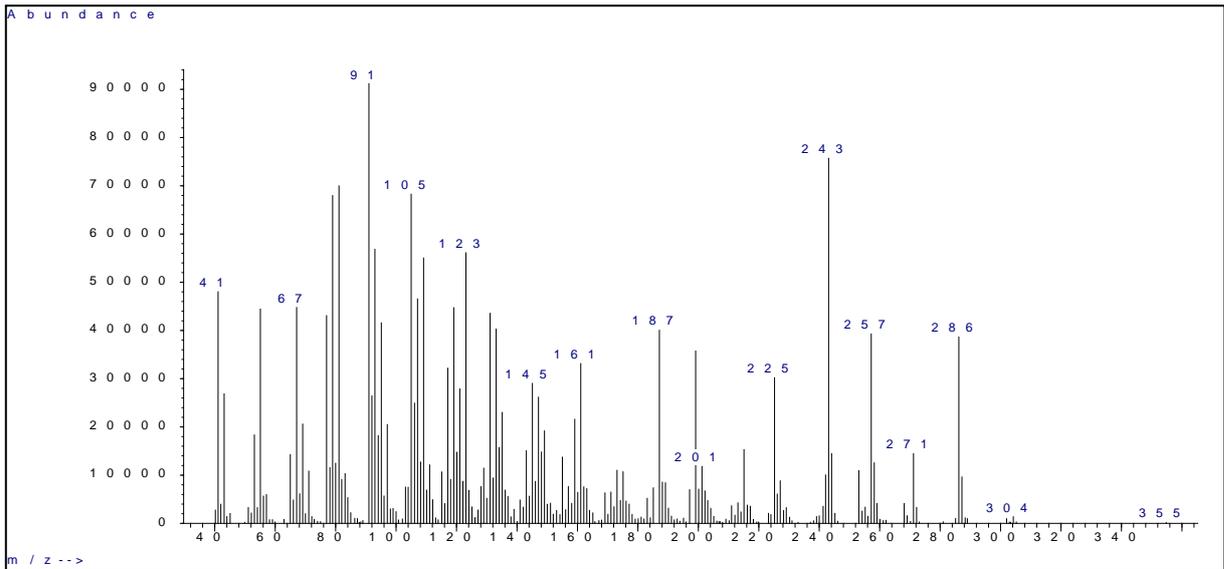
NI (M=204), IR=1479, tR(min)= 26,382, Conc.rel.%= 0,547.



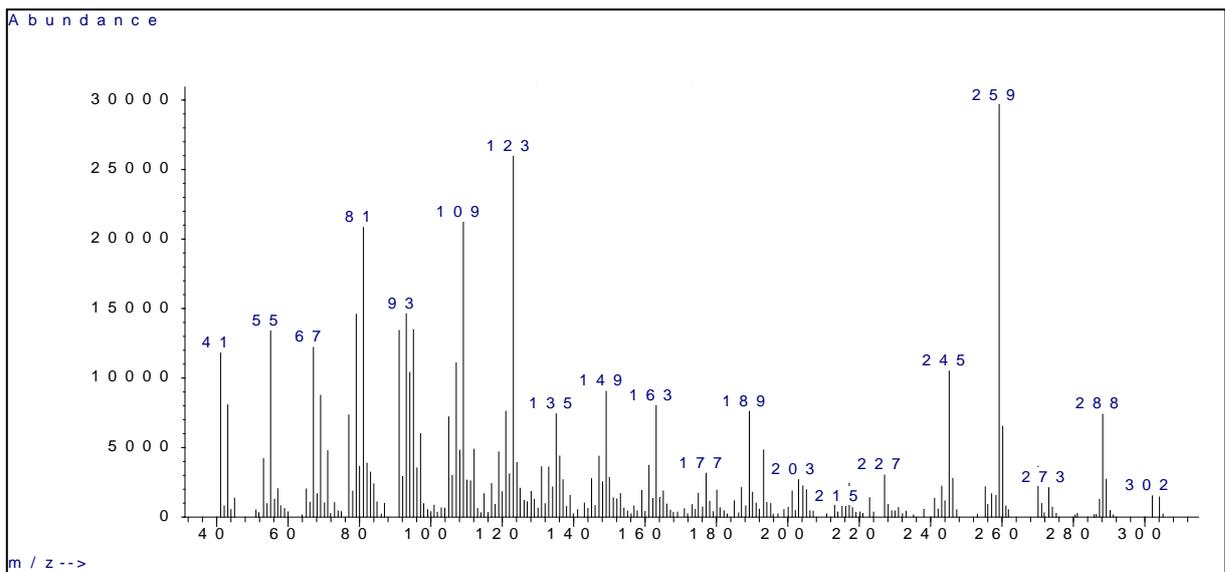
NI (M=206), IR=1633, tR(min)= 32,298, Conc.rel.%= 0,55.



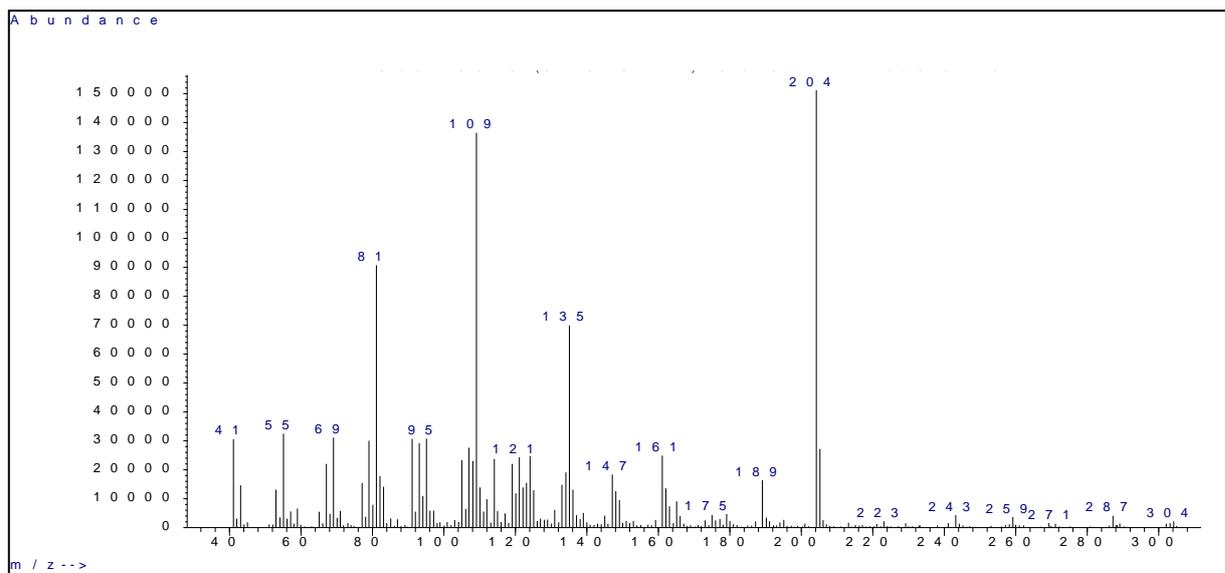
NI (M= 304), IR=1983, tR(min)= 44,263, Conc. rel. %= 0,17.



NI (M= 286), tR(min)= 52,189, Conc.rel. %= 1,36.



NI(M=302), tR(min)= 52,645, Conc. rel. %= 0,23.



NI(M=304), tR(min)= 54,810, Conc. rel. %= 0,80.