

TATIANA RANIERI

Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Heidge Fukumasu

São Paulo

2015



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



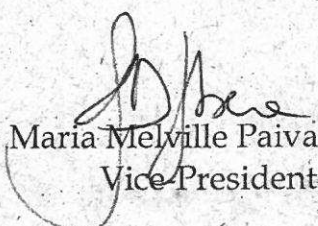
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo da Copaifera reticulata Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão", protocolado sob o nº 980120052015, utilizando linhagens de células murinas e de pulmão humano, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Heidge Fukumasu, foi aprovado *ad referendum* e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Conforme declaração do pesquisador: "*As linhagens E9 e E10 são oriundas de explante de pulmão de camundongo e mantidas in vitro por Smith e et al em 1984. Já foram muito bem caracterizadas e utilizadas em muitos experimentos e artigos ... As linhagens humanas são todas oriundas de explantes de tumores humanos de pulmão principalmente pelo NCI-NiH (National Cancer Institute - National Institutes of Health) e estão disponíveis no site da ATCC (atcc.org) ... Todas as linhagens foram obtidas por doação do Laboratório de Oncologia Comparada do NCI (Fredericks-EUA)*".

São Paulo, 27 de julho de 2015.


Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Milton e Silvia, por todo amor que sempre tive, por nunca desistirem da vida e principalmente por apoiarem incondicionalmente a minha paixão por Ciências.

Dedico também à pequena Olívia, minha sobrinha, para que seja um mínimo incentivo à sua curiosidade criativa tão inspiradora!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir mais algum tempo aqui na Terra, planeta que tanto amo. Que eu continue firme no meu caminho e que eu consiga seguir com a minha missão...

Agradeço imensamente ao meu queridíssimo orientador o Prof. Dr. Heidge Fukumasu, sem o qual nada aconteceria. Obrigada por todas as oportunidades, por compartilhar sempre, por me incentivar em todas as situações, pelas broncas, por toda a paciência oriental, por sermos tão diferentes e ainda assim existir tanto respeito mútuo. Obrigada por ser exatamente como você é e por me ajudar a crescer nessa carreira que é a minha vida. Minha gratidão por tudo sempre e para sempre! Você é o melhor!!

Agradeço a minha “grande família” por toda torcida, esperança, incentivo e confiança. Agradeço por cada dia com vocês, agradeço por sermos assim tão nós!! Agradeço por estarmos unidos nessa vida e por compartilharmos desse amor! Sem vocês nada disso seria possível. Vamos em frente! Pai, mãe, irmãs, tia, cunhado e sobrinha amo muito vocês!!

Agradeço a Profa. Silvana Górnjak por ter permitido que eu continuasse “minha caminhada” mesmo sem saber se eu poderia “andar”... Minha gratidão à senhora por tudo! Isso me animou muito e me ajudou a lutar para aproveitar a pós-graduação! Obrigada de coração Professora!

Agradeço a todo o pessoal da FMVZ, funcionários, alunos e colegas e aos professores. Nem posso descrever a emoção e o orgulho que sinto por fazer parte dessa história! Meu carinho mais que especial à Sra Elza da Biblioteca FMVZ.

Prof. Dr. Palermo, Profa. Dra. Cris Massoco e Profa. Dra. Malu Dagli: meu carinho sempre e minha gratidão por todas as coisas boas que passei ai em São Paulo! Agradeço imensamente essa oportunidade que tive na minha vida de conviver com pessoas tão interessantes e especiais! Obrigada!!

Agradeço também a todo o pessoal aqui da FZEA, que me acolheu tão bem nesses 3 anos de correria. A fazenda é perfeita!

O meu mais que muuuito obrigada a Super Nina (Arina), por ser uma pessoa como poucas, por me salvar sempre, por ter cadernos mágicos, por ser tão prestativa, paciente e amiga. Foi uma honra poder trabalhar ao seu lado! Gratidão por tudo!

Ao grupo do LOCT (LOST para os íntimos) o meu sincero agradecimento pelo acolhimento, pelas reuniões científicas e pelo trabalho que está só começando! Boa sorte pessoal!

A Lídia Pulz agradeço todos os dias pela indicação para o estágio obrigatório e por me proporcionar a realização desse sonho.

Agradeço ao Nilton por sua boa vontade comigo sempre, por me ajudar com os fungos e por toda experiência que trocamos por difusão facilitada! Obrigada!

Agradeço muito a Martini por ter me ajudado com o citômetro, por ter me emprestado células para validar meus fungos e por ser um exemplo para todos nós! Obrigada!

Aos meus professores da graduação eu agradeço imensamente, em especial a Profa. Andréa S. Chanquetti, ao Prof. Marcelo Contieri, a Profa. Dra. Katia Iseki e ao Prof. Dr. Elton Sterzo. Muito obrigada de todo o coração por terem tido tanta paciência comigo, por todas as oportunidades e ensinamentos que foram essenciais para que eu pudesse estar aqui na USP hoje. Obrigada!

Ao meu Prof. e amigo Heros minha eterna gratidão por ter me transformado numa pessoa mais louca! Obrigada por me apresentar o mundo da microbiologia e por me fazer pensar, me tornando uma apaixonada por fungos! Ainda vai ouvir falar deles!! Gratidão meu querido!

A Profa. Dra. Karina M. Madureira agradeço todos os dias por ter regado essa semente da pesquisa na minha vida, por trazer esse dom de volta e por juntas

termos colhido bons frutos! Milga to só começando! Obrigada vezes por tudo o que fez por mim! Será minha eterna orientadora!

Agradeço especialmente ao CNPq pelo incentivo à pesquisa em nosso país e também por oferecer condições para a realização desse projeto.

Agradeço a FAPESP por financiar grande parte dos equipamentos e materiais que utilizamos nesse experimento.

Minha gratidão a Senhora Daura por sua boa vontade! Meu carinho!

Aos meus amigos queridos agradeço por entenderem minhas ausências infinitas e por estarem sempre por perto! Essa família é perfeita!! Amo vocês!!

A Clarissa agradeço por tudo que já passou e pelo caminho que houver. Obrigada por ter ficado ao meu lado quando eu mais precisei! Gratidão!

Camiiii!!! Esse é especial pra você que me ajudou tanto nos piores momentos que passei aqui na pós, por ser a rainha da organização e me salvar sempre!! Quando crescer quero ser que nem você! Sucesso na sua vida! Obrigada!!

E finalmente agradeço ao Dr. Hélio, sem o qual eu certamente não estaria aqui digitando minha dissertação agora... Agradeço ao senhor pela minha vida e por todo carinho que teve por mim e pela minha família! O senhor é maravilhoso! Gratidão!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda humanidade”

Marie Curie

RESUMO

RANIERI, T. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke em células cancerosas de pulmão.** [Evaluation of antineoplastic effects of *Copaifera reticulata* Ducke oil in lung cancer cells]. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nos últimos anos as evidências de novos casos de câncer têm alarmado o mundo. O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis propriedades antineoplásicas atribuídas ao óleo de *Copaifera reticulata* Ducke pela etnofarmacologia. Ocorreu pela análise da citotoxicidade deste em cultivos de células normais e cancerosas de pulmão, murinas E10 e E9 e humanas das linhagens NCI-H460 e NCI-H2023. Os cultivos após serem incubados a 37°C foram expostos a oito diferentes concentrações do óleo diluído em meio de cultivo permanecendo em estufa por 48 h na mesma temperatura. Decorrido esse tempo, adicionou-se o reagente MTT para leitura espectrofotométrica. Com a avaliação dos resultados dessa leitura, observou-se um grande potencial antitumoral do referido óleo, determinando-se sua IC50 para todas as células estudadas. Através da observação e captação de imagens microscópicas foi possível observar alterações morfológicas nas células nas diferentes concentrações do tratamento, havendo diferença entre a quantidade de células viáveis normais e neoplásicas. Concluiu-se que o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke demonstrou efeito antineoplásico em duas linhagens de células neoplásicas do pulmão humano, bem como na linhagem murina E9, sendo que estudos efetuados para a caracterização de apoptose por fluorescência e alterações no ciclo celular nas células humanas reiteraram seu potencial como um agente contra o câncer.

Palavras-chave: Antitumoral. Fitoterápico. Plantas medicinais. Quimioterapia. Diterpenos.

ABSTRACT

RANIERI, T. **Evaluation of antineoplastic effects of *Copaifera reticulata* Ducke oil in lung cancer cells.** [Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke em células cancerosas de pulmão]. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In recent years evidences of new cancer cases in the world have been alarmed. The aim of this study was to evaluate the antineoplastic properties attributed to the *Copaifera reticulata* Ducke oil by ethnopharmacology. These analysis of cytotoxicity occurred through this normal murine cells E10 and lung cancer murine cells E9 and human lung cancer cell lines NCI-H460 and NCI-H2023. The cultures after being incubated at 37°C were exposed with eight different oil concentrations diluted in warmed culture medium, remaining in incubator for 48 hours at the same temperature. After this time, added MTT reagent for spectrophotometric reading. With this reading analysis results it was observed a great potential antitumor of this oil determining their IC50 for all cells studied. Through the microscopic images were possible to observe morphological changes in cells in different concentration of the oil exposure, differentiating normal cells from neoplastic cells. It was concluded that the *Copaifera reticulata* Ducke oil has the antineoplastic effect in two human lung cancer cell lines of as well as in murine cells E9, but the effect was not observed in E10 under the same conditions. Studies made in order to apoptosis characterization by fluorescence and cell cycle changes in human cells, confirming its potential as agent against cancer.

Keywords: Antineoplastic agents. Phytotherapy. Herbal therapy. Chemotherapy. Diterpenos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valor da IC50 encontrado para as células murinas E9 e E10 e para as células neoplásicas de pulmão humano H460 e H2023

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células de linhagem H460 tratadas com diferentes concentrações de *Copaifera reticulata Ducke*. Em A observa-se o controle após 24 horas, em B observa-se a exposição das células à concentração 0,075µl/ml, em C o crescimento celular na concentração 0,30µl/ml e em D observa-se as células expostas a concentração de 0,60µl/ml

Figura 2 - Células de linhagem H2023 tratadas com diferentes concentrações de *Copaifera reticulata Ducke*. Em A observa-se o controle após 48 horas, em B observa-se a exposição das células à concentração 0,037µl/ml, a menor diluição estudada, em C o crescimento celular na concentração 0,30µl/ml e em D observa-se as células expostas a concentração de 0,60µl/ml

Figura 3 - Representa a reação de MTT em células neoplásicas tipo H460 após 3 horas. Em A observa-se os cristais de formazan nas células, sua morfologia, intensidade e coloração e em B observa-se alterações nas células expostas ao OCR na concentração de 0,30µl/ml

Figura 4 - Quantificação de apoptose por fluorescência através do Laranja de Acridina e do Brometo de Etídio, onde A representa o controle; em B observa-se a concentração 0,16µl/ml; em C encontra-se a IC50, de concentração 0,32 µl/ml e em D a concentração 0,64µl/ml

Figura 5 - Células de linhagem H460 tratadas com óleo de *Copaifera reticulata Ducke* na concentração de 0,32µl/ml (IC50). As setas evidenciam as características morfológicas utilizadas para a contagem das células e a quantificação de apoptose. Onde, A são células apoptóticas, N células necróticas e L células vivas.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Testes de viabilidade celular realizados por espectrofotometria de absorvância para cálculo de IC50 de células de linhagens murinas E9 e E10

Gráfico 2 - Testes de viabilidade celular realizados por espectrofotometria de absorvância para cálculo de IC50 de células de linhagens H460 e H2023

Gráfico 3 - Quantificação de apoptose através da fluorescência por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). Representação gráfica da contagem de 1×10^3 células do controle e das 3 diferentes concentrações avaliadas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1. BREVE HISTÓRICO.....	24
3.2. ÓLEO DE COPAÍBA.....	28
4. OBJETIVOS.....	33
5. MÉTODOS.....	35
5.1. ÓLEO DE <i>COPAIFERA RETICULATA DUCKE</i> (OCR).....	35
5.2. LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.....	35
5.3. CULTIVO DE CÉLULAS.....	35
5.4. EXPOSIÇÃO COM <i>COPAIFERA RETICULATA DUCKE</i>	37
5.5. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	38
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.7. TESTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE.....	40
5.8. CICLO CELULAR.....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1. AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE <i>COPAIFERA RETICULATA DUCKE</i> (OCR).....	43
6.2. VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO OC EM MODELOS MURINOS DE CÉLULAS NORMAIS (E10) E NEOPLÁSICAS (E9) DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS.....	43
6.3. VALIDAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ÓLEO DA <i>COPAIFERA RETICULATA DUCKE</i> EM LINHAGENS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DO PULMÃO HUMANO DOS TIPOS NCI-H460 E NCI-H2023.....	44
6.4. ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO ÓLEO DA <i>COPAIFERA RETICULATA DUCKE</i> EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS DO PULMÃO HUMANO DE LINHAGEM NCI-H460 ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE POR FLUORESCÊNCIA.....	48
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O crescente número de casos de câncer nos últimos anos é evidente. As informações sobre a patologia têm alarmado as pessoas do mundo todo e despertado o interesse dos cientistas para encontrar formas para entender a sua biologia. Ainda são necessários muitos estudos na intenção de conter essa doença que segundo o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar - INCA (2014) é a segunda maior causa de mortes no mundo. Os cânceres são doenças causadas pelo acúmulo de alterações genéticas (MITCHELL, 2006; KUMAR ET. AL, 2008) e epigenéticas, onde seu desenvolvimento compreende alterações em pelo menos oito pontos-chave (*hallmarks*) moleculares (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A descoberta de que o consumo de determinadas espécies de plantas medicinais poderia trazer benefícios para a saúde tem influenciado a vida das pessoas no mundo contemporâneo. Somente a partir do século XX algumas dessas espécies tornaram-se parte da farmacopéia mundial, sendo alvos de investigações (ELWIN LEWIS, 2001).

O uso de produtos naturais é uma alternativa na terapia de humanos e animais, incluindo doenças como o câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005; BULLITTA; PILUZZA; VIEGI, 2007). Algumas medidas simples como o consumo de frutas, hortaliças e grãos inteiros poderiam ajudar na prevenção dessa doença como explicaram Padilha e Pinheiro (2004), surgiu então à hipótese da existência de metabólitos secundários das plantas, biologicamente ativos, que pudessem ser responsáveis por essa ação (SURH, 2003; PADILHA; PINHEIRO, 2004). Intensificou-se a busca por alternativas naturais como a descoberta de fitoquímicos capazes de promover ação antineoplásica para quimioprevenção e o controle da carcinogênese (SPORN; SUH, 2002; SURH, 2003; SPINOLA; MANZZO; ROCHA, 2007).

Na biodiversidade brasileira são inúmeras as plantas com indicações etnofarmacológicas como relataram Barreiro e Bolzani (2009) e Packer e Luz, (2007), inclusive para o controle do câncer e muitas dessas plantas encontram-se em estudo atualmente (CRAGG; NEWMAN, 2005; FUKUMASU et al., 2006, 2008). Uma delas é a *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), uma árvore frondosa, de aproximadamente 40 metros de altura, que é facilmente encontrada na floresta

Amazônica e também cresce nas regiões centro oeste e nordeste do país, sendo encontrada apenas no Brasil (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

A *Copaifera reticulata* Ducke assim como todas as outras árvores do gênero *Copaifera*, descritas por pesquisadores como Veiga Junior e Pinto (2002), Oliveira et al. (2006), Veiga Junior, Rosas, Carvalho, Henriques, e Pinto (2007), Sachetti et al (2009) e Alfonso-Goldfarb, Ferraz, e Beltran (2010), produzem um exudato que varia de amarelo claro a marrom, chamado de Óleo de Copaíba (OC) e é popularmente conhecido como antibiótico, antiinflamatório, antifúngico e larvicida (ALFONSO-GOLDFARB, FERRAZ E BELTRAN, 2010; OLIVEIRA, LAMEIRA E ZOGHBI, 2006; SACHETTI et al., 2009; VEIGA JUNIOR E PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR, E C, ET AL., 2007). Esse óleo possui composição química variada, quando se comparam as espécies, mas todas possuem o ácido copálico, o qual as caracteriza. É composto por diterpenos encontrados na fração resina, e por sesquiterpenos presentes na fração volátil, que são específicos e estão presentes em quantidades distintas quando se comparam as espécies (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Veiga Jr. et al (2007) encontraram na *Copaifera reticulata* Ducke o ácido caurenóico em maior quantidade que nas outras *Copaiferas* já estudadas. Acredita-se que os diterpenos cauranos presentes nessa espécie sejam componentes biologicamente ativos de interesse no estudo desse óleo (SACHETTI et al., 2009).

Experimentos relacionados à toxicidade oral aguda e efeitos neurotóxicos realizados por Sachetti et al (2009), demonstraram que não houve mortalidade ou morbidade de ratas nulíparas Wistar com a administração de doses repetidas por gavagem até 2000mg/kg, nem a ocorrência de toxicidade neurológica, hepática ou renal ao fim do experimento. Desta forma, a toxicidade oral letal do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke (TOLOC) aguda é maior que 2000mg/kg, havendo uma relativa margem de segurança para utilizar o óleo como agente terapêutico.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A complexidade das doenças oncológicas favorece a busca por outras terapias e alternativas na tentativa de controlá-las, entre elas as terapias naturais com a utilização de plantas medicinais (PEDREIRA, 2007).

Existem 72 espécies do gênero *Copaifera* no mundo, sendo que 16 delas são encontradas exclusivamente no Brasil, o país que abriga mais espécies (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Para Veiga et al (2002) o óleo que essas árvores produzem funciona como defesa da planta contra animais, parasitas, fungos e bactérias. Pode ser fracionado em porção volátil e porção resina e seus principais componentes são respectivamente sesquiterpenos e diterpenos, substâncias de grande interesse científico para ação antitumoral, pois experimentalmente foram os principais agentes biologicamente ativos dessa planta (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; LIMA et al., 2003; LEANDRO et al., 2012; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

O balsamo foi capaz de promover ação antitumoral *in vitro* e *in vivo* como explicaram Pedreira (2007), Chicaro (2009), Sachetti et al (2009) e Almeida et al (2012) em seus estudos, mas a ação antiinflamatória atribuída a porção volátil é a mais amplamente difundida (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PEDREIRA, 2007; SACHETTI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012). O estudo de substâncias antiinflamatórias como o óleo, pode ser um importante caminho para desenvolver e aperfeiçoar novos agentes quimioterápicos contra o câncer como explicaram os autores Sachetti et al (2009).

O óleo possui indicações alternativas que poderiam interferir de forma positiva, amenizando alguns sinais da síndrome paraneoplásica, como a ação de regeneração tecidual (PEDREIRA, 2007; LEANDRO et al., 2012), cicatrização (MESQUITA, 2009; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; LEANDRO et al., 2012) a ação antifúngica (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; LEANDRO et al., 2012), a antiedematogênica (PEDREIRA, 2007; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009), atuando principalmente na diminuição da permeabilidade vascular e liberação da histamina (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998).

O óleo de Copaíba apresentou potente ação na inibição da proliferação celular e na indução de apoptose em experimento de Chicaro (2009). Outro experimento utilizou diferentes óleos de Copaíba e suas frações como agentes antitumorais *in vitro* e *in vivo* e foi realizado por Pedreira (2007), sendo que o óleo natural e o óleo reconstituído apresentaram-se mais eficientes que suas frações isoladas (volátil e resina) para os parâmetros de morte celular avaliados, utilizando células neoplásicas e tumores bucais induzidos DMBA em hamsters.

A nossa proposta foi utilizar o óleo *in natura*, pois além de melhores resultados encontrados pelos autores Lima et al (2003) e Pedreira (2007), é a forma como ele é usado pela população das várias regiões do Brasil, especialmente a região amazônica (PEDREIRA, 2007)

O óleo da *Copaifera reticulata* Ducke (OCR) por sua vez, foi escolhido para esse estudo, por ser uma espécie endêmica brasileira, como descrito por Veiga et al (2002) e por ser a espécie que apresentou a maior produção de óleo (com a qualidade preservada) em estudo realizado por Oliveira et al (2006) tornando-se assim um alvo potencial de grande interesse comercial (ALFONSO-GOLDFARB; FERRAZ; BELTRAN, 2010). O óleo pode ser extraído de maneira sustentável, sem nenhum prejuízo para a planta ou ambiente, e isso pode ser feito por muitos anos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Pode ser utilizado assim que deixa a árvore, não necessitando de equipamentos ou processos físico-químicos para sua obtenção sendo acessível também à população de baixa renda, mas ainda é um subproduto do desmatamento ilegal (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Sabe-se que, para ser um agente quimioterápico em potencial o fármaco não pode ser tóxico, deve ser altamente eficaz, preferencialmente administrado por via oral, ter mecanismo de ação conhecido e baixo custo, sendo que não há no mercado, até o momento, nenhum agente químico que apresente todas as características (SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI 2006).

Em estudos publicados nas últimas décadas muito se elucidou sobre as ações atribuídas ao óleo de Copaíba, mas pouco se sabe sobre a sua potente ação antineoplásica já identificada em algumas espécies (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; LIMA et al., 2003; PEDREIRA, 2007; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

Com a resposta da citotoxicidade do OCR para as amostras de células normais e neoplásicas, e possivelmente a forma como as mortes ocorrem nas células, ficaremos mais perto de encontrar o modo de ação desse composto vegetal tornando-o assim um possível agente quimioterápico em potencial.

O estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais visa comprovar sua eficácia e citotoxicidade pensando em benefícios para o uso humano (CAVALCANTI et al., 2006; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014) podendo minimizar a eutanásia de animais experimentais.

3. REVISÃO

3.1. BREVE HISTÓRICO

As pesquisas que têm surgido nos últimos anos indicam que alguns fármacos podem interferir no desenvolvimento tumoral podendo aumentar e muito o tempo de sobrevivência dos pacientes que desenvolvem neoplasias malignas (MORAES et al., 1997; DI STASI et al., 2002; SPORN; SUH, 2002). Os fármacos podem ainda ter ação sobre a viabilidade dessas células e no combate imunológico dessas patologias experimentalmente (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998; PEDREIRA, 2007).

No contexto desses estudos, cresce o uso de plantas usadas experimentalmente, levando-se em conta que o Brasil é o detentor do maior número de espécies endêmicas do planeta, pois hospeda até 20% de toda biodiversidade existente. (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998; PEDREIRA, 2007; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Sendo assim, as pesquisas de descobertas de novos fármacos ou fitofármacos, mesmo que apenas os protótipos, podem viabilizar avanços na pesquisa básica e multidisciplinar podendo ainda contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Mesmo com uma das maiores biodiversidades do planeta e detendo o maior número de espécies endêmicas como a *Copaifera reticulata* Ducke, o bioma brasileiro é pouco explorado como fonte de substâncias de interesse farmacológico (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Estudos farmacológicos pré-clínicos realizados no laboratório, principalmente, podem comprovar benefícios terapêuticos e a toxicidade dos produtos em células antes de utilizá-los em animais e seres humanos, diminuindo consideravelmente o número de animais no processo (PEDREIRA, 2007; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

A quimioprevenção é uma ferramenta da farmacologia em evidência nas últimas décadas (FUKUMASU et al., 2006; PEDREIRA, 2007) que pretende identificar substâncias que possam inibir o desenvolvimento tumoral em estádios

precoces, ou não, impedindo o desenvolvimento da neoplasia em seus mais variados fenótipos e graus de diferenciação e também as metástases, em pacientes com doença já estabelecida (PEDREIRA, 2007).

A utilização de vegetais para fabricação de remédios e drogas, remonta das civilizações mais antigas como o código de Hamurabi (2.000 a.c.), o Papiro de Ebers do Egito (1.500 a.c.) e Galeno (131 a.c.) como explicaram Spinosa et al (2006) e as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças que afetam a população desde então (PEDREIRA, 2007; LIMA NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008).

As pesquisas com as plantas medicinais iniciou-se de forma eficaz apenas no século XIX, quando um farmacêutico alemão chamado Friederich Wilhelm Seturner isolou a morfina do ópio (PEDREIRA, 2007). Depois disso, muitos outros fármacos que compõe nosso arsenal terapêutico foram derivados da purificação de vegetais e seus extratos e do isolamento de seus princípios ativos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PEDREIRA, 2007).

A terapia através das plantas ou fitoterapia é acessível à população de baixa renda que sabidamente não tem o mesmo acesso aos medicamentos industrializados, sendo um medicamento mais barato e de qualidade comprovada (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Talvez por isso os mesmos autores explicaram que a busca por novos medicamentos em florestas tropicais é hoje uma esperança para os pacientes oncológicos e um caminho aos pesquisadores de todo o mundo.

Um grande desafio é encontrar componentes ativos e conhecer seu mecanismo de ação, sendo esses os principais objetos de estudo da farmacologia botânica (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MESQUITA, 2009).

Mesmo que o Brasil seja um país tão rico em biodiversidade e domine tecnologias para produção de medicamentos através de plantas medicinais, o desconhecimento médico acerca dos princípios ativos das plantas, sobre as indicações e contra-indicações dos fitofarmacos e ainda a descrença na eficácia de ação desses produtos dificulta o seu uso e sua evolução (VEIGA JUNIOR et al., 2007c; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014)

A organização mundial da saúde (OMS) define plantas medicinais com sendo todo e qualquer vegetal que possui substancias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou fornecerem caminhos para fármacos sintéticos podendo ser

aplicadas no organismo animal com resultados científicos comprovados (WHO/IUCN/WWF, 1993)

Nos dias atuais, o estudo de plantas medicinais e de produtos naturais, está relacionado com temas polêmicos como a conservação do meio ambiente, a preservação dos povos e patrimônios indígenas e a biopirataria (PEDREIRA, 2007). Como relata o mesmo autor, em estudo realizado com drogas derivadas de plantas utilizadas em larga escala em todo o mundo, verificou-se que 74% delas tinham as mesmas indicações de uso que das plantas as quais derivaram, fato que embasa a idéia de que pesquisas com novas plantas medicinais são um imenso caminho a ser percorrido, considerando o uso popular e as características etnofarmacológicas. Pensando nisso, alguns trabalhos indicam que as plantas medicinais podem ser usadas para o tratamento dos tumores (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; LIMA et al., 2003; PEDREIRA, 2007; CHICARO, 2009; SENEDESE et al., 2013). As pesquisas que têm surgido nos últimos anos indicam que alguns fármacos podem interferir no desenvolvimento tumoral podendo aumentar e muito o tempo de sobrevivência dos pacientes que desenvolvem neoplasias malignas (MORAES et al., 1997; DI STASI et al., 2002; SPORN; SUH, 2002). Os fármacos podem ainda ter ação sobre a viabilidade dessas células e no combate imunológico dessas patologias experimentalmente (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998; PEDREIRA, 2007).

No contexto desses estudos, cresce o uso de plantas usadas experimentalmente, levando-se em conta que o Brasil é o detentor do maior número de espécies endêmicas do planeta, pois hospeda até 20% de toda biodiversidade existente. (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998; PEDREIRA, 2007; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Sendo assim, as pesquisas de descobertas de novos fármacos ou fitofarmacos, mesmo que apenas os protótipos, podem viabilizar avanços na pesquisa básica e multidisciplinar podendo ainda contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Mesmo com uma das maiores biodiversidades do planeta e detendo o maior número de espécies endêmicas como a *Copaifera reticulata* Ducke, o bioma brasileiro é pouco explorado como fonte de substâncias de interesse farmacológico (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Estudos farmacológicos pré-clínicos realizados no laboratório, principalmente, podem comprovar benefícios terapêuticos e a toxicidade dos

produtos em células antes de utilizá-los em animais e seres humanos, diminuindo consideravelmente o número de animais no processo (PEDREIRA, 2007; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

A quimioprevenção é uma ferramenta da farmacologia em evidencia nas ultimas décadas (FUKUMASU et al., 2006; PEDREIRA, 2007) que pretende identificar substancias que possam inibir o desenvolvimento tumoral em estádios precoces, ou não, impedindo o desenvolvimento da neoplasia em seus mais variados fenótipos e graus de diferenciação e também as metástases, em pacientes com doença já estabelecida (PEDREIRA, 2007).

A utilização de vegetais para fabricação de remédios e drogas, remonta das civilizações mais antigas como o código de Hamurabi (2.000 a.c.), o Papiro de Ebers do Egito (1.500 a.c.) e Galeno (131 a.c.) como explicaram Spinosa et al (2006) e as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças que afetam a população desde então (PEDREIRA, 2007; LIMA NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008).

As pesquisas com plantas medicinais iniciaram-se de forma eficaz apenas no século XIX, quando um farmacêutico alemão chamado Friederich Wilhelm Seturner isolou a morfina do ópio (PEDREIRA, 2007). Depois disso, muitos outros fármacos que compõe nosso arsenal terapêutico foram derivados da purificação de vegetais e seus extratos e do isolamento de seus princípios ativos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PEDREIRA, 2007).

A terapia através das plantas ou fitoterapia é acessível à população de baixa renda que sabidamente não tem o mesmo acesso aos medicamentos industrializados, sendo um medicamento mais barato e de qualidade comprovada (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Talvez por isso, os mesmos autores relatam que a busca por novos medicamentos em florestas tropicais é hoje uma esperança para os pacientes oncológicos e um caminho aos pesquisadores de todo o mundo.

Um grande desafio é encontrar componentes ativos e conhecer seu mecanismo de ação, sendo esses os principais objetos de estudo da farmacologia botânica (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MESQUITA, 2009).

Mesmo que o Brasil seja um país tão rico em biodiversidade e domine tecnologias para produção de medicamentos através de plantas medicinais, o desconhecimento médico acerca dos princípios ativos das plantas, sobre as

indicações e contra-indicações dos fitofarmacos e ainda a descrença na eficácia de ação desses produtos dificulta o seu uso e sua evolução (VEIGA JUNIOR et al., 2007; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014)

A organização mundial da saúde (OMS) define plantas medicinais com sendo todo e qualquer vegetal que possui substancias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou fornecerem caminhos para fármacos sintéticos podendo ser aplicadas no organismo animal com resultados científicos comprovados (WHO/IUCN/WWF, 1993)

Nos dias atuais, o estudo de plantas medicinais e de produtos naturais, está relacionado com temas polêmicos como a conservação do meio ambiente, a preservação dos povos e patrimônios indígenas e a biopirataria (PEDREIRA, 2007). Como relata o mesmo autor, em estudo realizado com drogas derivadas de plantas utilizadas em larga escala em todo o mundo, verificou-se que 74% delas tinham as mesmas indicações de uso que das plantas as quais derivaram, fato que embasa a idéia de que pesquisas com novas plantas medicinais são um imenso caminho a ser percorrido, considerando o uso popular e as características etnofarmacológicas. Pensando nisso, alguns trabalhos indicam que as plantas medicinais podem ser usadas para o tratamento dos tumores (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; LIMA et al., 2003; PEDREIRA, 2007; CHICARO, 2009; SENEDESE et al., 2013). Levando em conta as indicações encontradas, imaginou-se que esses preparados fitoquímicos pudessem agir sobre a massa tumoral. O uso de preparados de plantas com critério pode contribuir com a saúde e seu restabelecimento. Pensado nisso, o quadro clínico, a escolha correta do vegetal, a preparação cuidadosa e o amplo conhecimento dos efeitos tóxicos são etapas imprescindíveis (CAVALCANTI et al., 2006; LEANDRO et al., 2012).

3.2. ÓLEO DE COPAÍBA:

A Copaíba (*Copaifera sp*) possui muitos nomes nas diferentes regiões do Brasil, entre eles Copaiabeira, Pau d'óleo, Copaiba vermelha, entre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002) e como explicou o autor, é uma árvore frondosa, de grande

porte da família Leguminosae. Pode alcançar 40 metros de altura e viver mais de 300 anos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

Seu nome vem do tupi “cupa-yba” e significa a árvore que tem depósito, ou jazida, por causa do óleo que fica no interior do seu tronco. As espécies de Copaíba são comumente encontradas na floresta amazônica, regiões centro-oeste, nordeste e sudeste do Brasil. (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). O óleo de Copaíba era bastante utilizado entre os índios brasileiros, quando os portugueses aqui chegaram e seu uso foi apoiado em animais que quando feridos esfregavam-se no tronco dessas árvores (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002)

Os índios o utilizavam muito, principalmente como cicatrizante, mas a escassez de remédios sofrida pelos colonizadores por conta do abastecimento irregular de Portugal fez com que esses recorressem às drogas indígenas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Os viajantes se abasteciam do óleo que era comprovadamente eficaz antes de se aventurarem por lugares até então desconhecidos.

A primeira citação conhecida do óleo de Copaíba brasileiro talvez tenha sido feita numa carta de Petrus Martius ao Papa Leão X, publicada em 1534. Na carta, faz referência ao “Copei” como uma droga indígena, de forte cheiro e com propriedades cicatrizantes (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Com o tempo e a intensificação das viagens extrativistas, os espanhóis conheceram o óleo e com ele aprenderam a curar suas feridas. Conta a história que os espanhóis deram valor ao óleo, diferente dos Portugueses que não se interessaram (ALFONSO-GOLDFARB; FERRAZ; BELTRAN, 2010).

Atualmente o óleo de Copaíba pode ser facilmente encontrado na região Norte, onde é vendido em mercados e feiras populares, com diferentes nomes e aplicações (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Seu uso foi tão difundido que o óleo tornou-se um dos remédios naturais mais usados e conhecidos, principalmente pelas populações mais pobres dessa região.

O óleo é utilizado como diurético, laxante, antitético, antiblenorrágico, anti-reumático, anti-séptico do aparelho urinário, cicatrizante, antiinflamatório e tem ação quimiopreventiva do câncer e tumoricida (BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; LIMA et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2006; PEDREIRA, 2007; VEIGA JUNIOR et al., 2007a; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

Estudos fitoquímicos mostram que os óleos de Copaíba verdadeiros possuem em sua composição essencialmente sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico e o β -cariofileno e o α -copaeno os seus principais componentes (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

No Brasil são encontradas mais de vinte espécies do óleo, e entre as mais abundantes estão a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera guianensis*, *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffi* e *Copaifera coriacea* (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A coleta do óleo pode ser realizada de forma sustentável pela através de um furo feito com um trado na parte superior do tronco até o seu lenho, posteriormente abre-se outro orifício na parte inferior do tronco de onde se obtém um líquido transparente de viscosidade variável e a coloração pode variar do amarelo claro ao marrom (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006) apresenta alto valor biológico, e pode ser utilizado por indústrias cosméticas e de vernizes, atuando como agente fixador (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

A falta de estudos químicos visando à caracterização do óleo de Copaíba mais a variabilidade natural da matéria prima e à crescente demanda do mercado por fitoterápicos, pode comprometer a qualidade, autenticidade e efetividade dos produtos à base do óleo de Copaíba (PEDREIRA, 2007; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Há ainda uma grande dificuldade em garantir a identidade botânica das *Copaiferas*, uma vez que o óleo está sendo obtido pelo desmatamento e pelo extrativismo sem critério ou discriminação de espécies (EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

Em qualquer parte do mundo o conhecimento de que as plantas da flora local são indicadas para tratar algumas enfermidades é um aspecto relevante a ser considerado (WHO/IUCN/WWF, 1993; CAPASSO et al., 2000; WHO, 2005).

A reparação tecidual representa um importante mecanismo de proteção e resposta a injúrias teciduais, a restauração da integridade funcional e estrutural do tecido lesado é essencial. Muitos extratos de plantas têm apresentado potencial terapêutico contribuindo para uma melhor reparação tecidual (PEDREIRA, 2007).

Um estudo desenvolvido pela Universidade de Campinas analisou substâncias sintetizadas a partir do óleo de Copaíba, apresentando resultados importantes contra nove linhagens de câncer, inibindo a proliferação de células

neoplásicas (PEDREIRA, 2007). O autor destaca que estudos com a Copaíba ainda são necessários, principalmente testes toxicológicos com a finalidade de avaliar se as substâncias não afetam também as células normais.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo

O principal objetivo desse estudo é realizar uma avaliação *in vitro* dos efeitos antineoplásicos do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke sobre linhagens diferentes de células cancerosas do pulmão.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliação dos efeitos citotóxicos do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke sobre linhagens de células neoplásicas e não neoplásicas humanas e murinas.
2. Determinação do modo de ação do efeito citotóxico seja por indução de apoptose ou alteração no ciclo celular.

METODOLOGIA

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÓLEO DE *COPAIFERA RETICULATA DUCKE* (OCR)

O óleo da *Copaifera reticulata Ducke* (OC) utilizado nesse estudo é proveniente da Floresta Nacional do Tapajós, km 67, município de Belterra - PA, obtido através de pesquisadores da EMBRAPA Amazônia Oriental sob exsicata nº183939 e foi utilizado na forma de óleo genuíno, natural ou balsamo.

5.2. LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

As linhagens utilizadas no presente experimento foram doadas pela Dra. Lucy M. Anderson, chefe do *Laboratory of Comparative Carcinogenesis* do *Frederick National Laboratory for Cancer Research* (EUA) e pertencem ao banco de células do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional - LOCT da Universidade de São Paulo. Consistem em linhagens murinas, do tipo normal (E10) e do tipo neoplásica (E9) e também de duas linhagens diferentes de células neoplásicas do pulmão humano, sendo uma linhagem de carcinoma de células gigantes NCI-H460 e a outra um carcinoma de células não pequenas NCI-H2023. As linhagens murinas foram escolhidas por permitirem a realização de ensaios de citotoxicidade entre células normais e neoplásicas.

5.3. CULTIVO DE CÉLULAS

As células de linhagens murinas E9 (neoplásicas) e E10 (não neoplásicas) e as células de linhagens humanas NCI-H460 (Carcinoma de células gigantes) e NCI-H2023 (Carcinoma de células não pequenas) foram descongeladas de acordo com o protocolo utilizado no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional - LOCT

da Universidade de São Paulo. Brevemente, após o preparo de 20 ml de meio completo e gelado para cada célula a ser descongelada, foram separados 10 ml em tubo falcon de 15ml para cada uma delas. As amostras foram selecionadas através de um arquivo escrito e posteriormente foram retiradas do tambor de nitrogênio líquido. O descongelamento foi rápido até a obtenção de uma pequena porção de gelo no fundo do criotubo. A desinfecção externa do criotubo foi realizada com álcool 70% antes de inseri-lo no fluxo. A suspensão de células foi pipetada e transferida para o tubo falcon separado anteriormente com 10 ml de meio e devidamente identificado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em 240 G ou 5 minutos em 370 G. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* precipitado foi ressuspenso em 10 ml de meio completo preparado previamente. As amostras foram colocadas individualmente em garrafas para cultura sobre superfície sólida T75 (75 cm², Sarstedt, Georgia, EUA) e incubadas a 37°C em estufa umidificada contendo 7% de gás carbônico (CO₂). As culturas foram observadas no dia seguinte para detecção de contaminações, morte celular e a aderência das células. As células das linhagens murinas foram cultivadas em meio de cultivo CRML (Invitrogen Life Technologies, EUA) com adição de 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Life Technologies, EUA), 2% GlutaMAX (Invitrogen Life Technologies, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (concentração final: 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina - Invitrogen Life Technologies, EUA) para controle antimicrobiano/antifúngico (meio de cultivo pronto). As células provenientes de linhagens humanas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, EUA - linhagens humanas) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Life Technologies, EUA), 2% GlutaMAX (Invitrogen Life Technologies, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (concentração final: 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina - Invitrogen Life Technologies, EUA) nas mesmas condições das células murinas. As garrafas de cultivo T75 foram acondicionadas em estufa com temperatura de 37°C e 7% de gás carbônico (CO₂) por 24 horas. Após esse período, as células foram observadas em microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Japão) e fotografadas para comparações morfológicas e arquivo. Ocorreu a aplicação de 5ml de PBS para remover células mortas e possíveis debris. Foi aplicado 5ml de Trypsina e após homogeneização, 4ml foram desprezados, deixando o restante para a dissociação celular ou seja, para que as células pudessem desprender-se, entre si e também da garrafa de cultivo,

para serem transferidas, observadas e contadas. As células desprendidas foram depositadas em 10ml de meio de cultivo pronto em temperatura de 37°C para realização do plaqueamento em 96 poços para a exposição ao OCR. Foi efetuada então a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, realizada por exclusão, utilizando-se para isso 10µL do corante Azul de Trypan e 10µL de meio de cultivo com células e assim foi definindo o numero de células por mililitro de meio. O valor foi calculado pelo numero de células contadas, dividido pelo número de quadrantes contados, multiplicado pela diluição 1:1 e multiplicado por 10⁴. O resultado corresponde ao valor de células em 1ml, logo foi possível calcular a porção desejada de 2 x 10³ células em volume. Foi calculado o volume de meio de cultivo com células necessário para ocupar um poço e com isso o volume total por placa de 96 poços e também a quantidade necessária para as replicas. A pipeta multicanal foi utilizada para a realização do plaqueamento e todos os cultivos foram feitos em triplicata em placas de 96 poços. A temperatura e o CO₂ permaneceram estáveis em 37°C e 7% de CO₂ durante todo processo experimental.

5.4. EXPOSIÇÃO COM *COPAIFERA RETICULATA DUCKE*

Diluiu-se 2,40µl do óleo natural ou balsamo de *Copaifera reticulata Ducke* (OCR) por ml de meio de cultivo utilizado pronto e aquecido em 37°C. Após ensaios iniciais para estabelecer as concentrações do tratamento proposto, oito concentrações distintas foram realizadas, sendo que a maior delas foi de 2,40µl de óleo por ml de meio pronto. Para a obtenção das oito frações do tratamento, a maior concentração foi separada em duas partes, uma delas foi reservada e a outra foi diluída na mesma quantidade de meio pronto, formando a concentração de 1,20µl de óleo por ml de meio, sendo a proporção 1:1. A diluição ocorreu da mesma forma com cada fração obtida sucessivamente até a obtenção da menor concentração estudada que foi de 0,018µl de óleo por ml de meio pronto. Estabeleceu-se então que, a concentração 1 seria a menor, com 0,018µl/ml, seguindo ordem crescente. Logo a concentração 2 foi de 0,037µl/ml, a 3 de 0,075µl/ml, a 4 de 0,15µl/ml, a 5 de 0,30µl/ml, a 6 de 0,60µl/ml, a 7 de 1,20µl/ml e finalmente a concentração 8 foi de 2,40µl/ml. Utilizou-se o banho-maria em 37°C para o aquecimento do meio de cultivo e do meio com o

OCR para serem utilizados no tratamento das células provenientes da estufa com a mesma temperatura. Para cada tipo de célula foi realizada a triplicata do cultivo, ou seja, foram feitas três placas de 96 poços para cada linhagem. As primeiras linhagens estudadas em triplicata foram as linhagens murinas, E9 e E10. Na sequência do experimento, realizou-se o cultivo em triplicata das células neoplásicas de pulmão humano das linhagens NCI-H460 e NCI-H2023. O cultivo ocorreu de forma similar entre as linhagens murinas e neoplásicas humanas, em coerência com as particularidades de cada uma. Nas placas de 96 poços, adicionou-se água ultrafiltrada e autoclavada em toda periferia das placas, ou seja, nas margens laterais, superior e inferior num total de 36 poços. A primeira coluna de cada sequência de placas foi ocupada apenas com meio de cultivo, sem células e sem óleo, sendo denominada coluna do branco ou controle negativo. As demais colunas foram ocupadas por meio de cultivo com células e foram incubadas em estufa por 24 horas na temperatura de 37°C e 7% de gás carbônico (CO₂). Transcorrido esse tempo, as placas foram observadas no microscópio invertido para a avaliação morfológica nas diferentes concentrações e fotografadas em colunas, sendo que, no mínimo dois poços de cada coluna e de cada uma das três placas foram fotografados. O meio de cultivo foi completamente removido de todas as placas com o auxílio de uma pipeta e um novo meio de cultivo foi adicionado em cada poço de cada uma das placas, sendo CRML para as linhagens murinas e RPMI 1640 para as linhagens humanas. Na coluna denominada branco ou controle negativo, apenas o meio de cultivo foi acondicionado, logo, nos poços da coluna 2 de todas as placas não haviam células. A coluna 3 de cada placa tornou-se o controle positivo, sendo composta por poços com meio de cultivo pronto acrescido de cada uma das quatro linhagens de células estudadas. A partir da quarta coluna de cada placa, iniciou-se o tratamento utilizando o meio de cultivo com OC em oito concentrações distintas como descrito anteriormente. Essas placas foram incubadas novamente na estufa a 37°C por mais 48 horas, tempo suficiente para que as células do controle positivo entrassem em confluência.

5.5. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria foi o método de eleição para quantificar os resultados da viabilidade celular após a exposição ao OC. O reagente MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Audrich, St. Louis, MO, EUA) foi usado para essa avaliação. O processo que possibilitou a leitura das placas no espectrofotômetro foi iniciado após as 48 horas de aplicação do tratamento com a retirada do meio de cultivo de todos os poços, os tratados com OCR e os não tratados, e adicionou-se 11µl do reagente MTT diluído em meio DMEM (Invitrogen Life Technologies, EUA) na concentração de 5mg/ml em cada um dos 60 poços válidos de cada placa confeccionada, incluindo a coluna do branco ou controle negativo. As placas voltaram à estufa por mais 3 horas para a reação de formação dos cristais de formazan, que ocorreu apenas nas células vivas. Após esse período, todo o líquido contido nas placas foi esgotado com o auxílio de papel absorvente. O álcool isopropílico foi utilizado nos 60 poços válidos de cada placa no volume de 100µl por poço para dissolver os cristais de formazan formados na reação de viabilidade celular possibilitando a leitura espectrofotométrica que ocorreu em seguida. O Espectrofotômetro (modelo, marca, país) é um equipamento amplamente utilizado nos laboratórios de pesquisa por ser capaz de medir e comparar a quantidade de luz ou radiação eletromagnética absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra, seja ela uma solução, um sólido transparente ou ainda um sólido opaco. O resultado da leitura espectrofotométrica é dado por um gráfico o espectro e indica a intensidade pelo comprimento de onda da fonte de luz. A radiação eletromagnética estudada aqui foi a absorvida, sendo chamada espectrofotometria por absorbância (A). Com os resultados obtidos na leitura espectrofotométrica por absorbância, foram realizados os cálculos pertinentes para avaliação do efeito do óleo sobre as células estudadas, cancerosas e não cancerosas. Com esses resultados obtidos a partir desses cálculos precisos, foi possível encontrar através de um programa estatístico (GraphpadPrism5.0, EUA), a IC50 ou o valor da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular de cada uma das quatro linhagens de células estudadas. As primeiras células avaliadas foram as murinas e devido aos resultados preliminares observados realizou-se o mesmo processo com as células neoplásicas do pulmão humano.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo da IC50 de cada célula avaliada foi realizado utilizando-se modelagem em curva de regressão não linear. As análises estatísticas dos dados de viabilidade celular foram comparadas em relação ao controle. Já o padrão de morte celular foi analisado por ANOVA de duas vias. Admitiu-se $p < 0.05$ para diferenças estatisticamente significantes. Para preparo dos gráficos assim como análise estatística foi utilizado o software GraphpadPrism5 (GraphPad Software, EUA).

5.7. TESTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE

Para verificar se o OC induzia à morte celular, foi utilizado o protocolo descrito por Ribble e colaboradores (2005). Brevemente, o protocolo experimental do tratamento foi realizado novamente com as células NCI-H460, onde se acrescentou três concentrações do OCR, uma acima e outra abaixo da IC50 pré-determinada. Ao final das 48 horas de exposição ao OCR, as placas de 96 poços foram centrifugadas por 5 minutos em 129G antes da aplicação de 8 μ l da solução sugerida (RIBBLE et al., 2005) com Laranja de Acridina (LA, SIGMA, St Louis, EUA) na concentração de 100 μ g/ml e Brometo de Etídio (BE, VETEC, Duque de Caxias, Brasil) na concentração de 100 μ g/ml. Essa centrifugação antes da aplicação dos reagentes corantes fluorescentes nos poços ocorreu para que a contagem fosse realmente abrangente, validando células desprendidas (mortas) e também fragmentos celulares. O Brometo de Etídio (BE) é um agente intercalante do DNA e é muito empregado para marcar ácidos nucléicos de células mortas corando seus núcleos de laranja/vermelho na luz U.V. O Laranja de Acridina (LA) é um corante fluorogênico acidotrópico que é capaz de identificar alterações estruturais em organelas na apoptose. Células vivas têm seus núcleos e citoplasmas corados pelo LA em verde. Esse corante liga-se a proteínas do citoesqueleto, e quando se encontra em um ambiente ácido, sofre modificações físico-químicas passando a emitir fluorescência vermelha na luz U.V. Com a clivagem dos microtúbulos, proteínas específicas do citosol passam a se localizar na membrana dos

autofagossomos tornando-os ácidos, assim como os autofagolisossomos. Então, células coradas em verde que apresentam elevada coloração vermelha, se encontram em autofagia. Foi utilizado o microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Japão) equipado com unidade de epifluorescência para captura das imagens uma vez que o tempo ideal para visualização da fluorescência é reduzido. A contagem de células vivas, necróticas ou apoptóticas foi realizada através das fotomicrografias em software ImageJ.ink 1.47 (National Institutes of Health - NIH, EUA) e contou-se pelo menos 1000 células por concentração, em cada replicata, observando-se atentamente as características morfológicas das células, dos núcleos celulares e também sua coloração.

5.8. CICLO CELULAR

Foi analisada de forma preliminar a distribuição das células pelas fases do ciclo celular através da técnica de impregnação nuclear por iodeto de propídeo (PI) (ELMORE, 2007). O PI intercala-se entre as fitas de DNA em células previamente permeabilizadas pela fixação em etanol 70%. Para a realização dessa etapa, utilizou-se 1×10^6 células E9 expostas ao OCR e não expostas, fixadas e conservadas em etanol 70% por 72 horas (-20°C). Após esse processo, as células foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos em 240 G) e incubadas no escuro com 200 μl de solução contendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de PI, 200 $\mu\text{g/ml}$ de RNase e 0,1% de Triton 100x em PBS. Após 30 minutos de incubação, 10000 eventos foram adquiridos por citometria de fluxo (Accuri C6 personal flow cytometer, Nova Jersey, EUA) utilizando filtro FL2, relacionado a intensidade de fluorescência das células e o filtro SSC, que está relacionado a complexidade interna das células analisadas, como o formato dos núcleos, presença de grânulos ou rugosidades na membrana. Após a leitura preliminar, as amostras foram analisadas pelo programa FlowJo (Tree star Inc, Asland, EUA) mas os resultados não foram expostos nesse trabalho.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

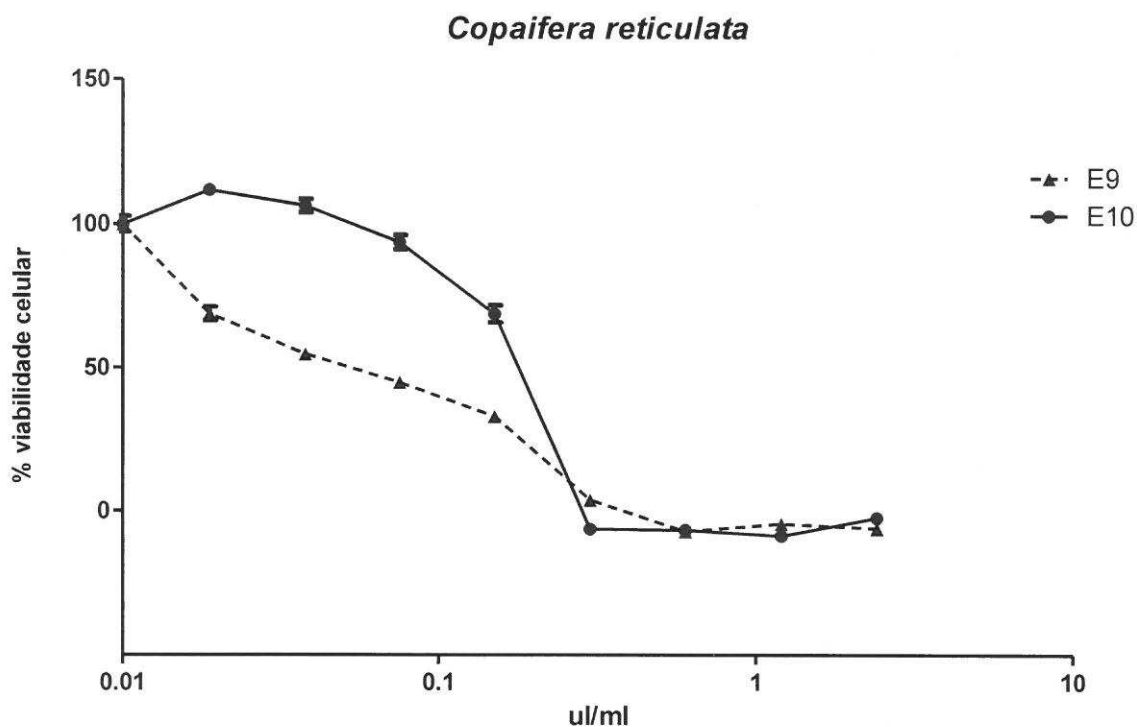
6.1. AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE *COPAIFERA RETICULATA DUCKE* (OCR).

O teste inicial de solubilidade do óleo de *Copaifera reticulata Ducke* (OCR) em duas partes de álcool etílico absoluto (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002) para identificação de adulterantes como óleos minerais e vegetais de menor valor agregado (VASCONCELOS; GODINHO, 2002) foi satisfatório. O OCR foi solúvel em álcool etílico absoluto diluindo-se completamente formando mistura homogênea ou seja, sem fases identificáveis mesmo após decantação. A coloração não foi alterada, nem apresentou qualquer turvação, preservou a coloração inicial como esperado

6.2. VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ÓLEO DA *COPAIFERA RETICULATA DUCKE* (OC) EM MODELOS MURINOS DE CÉLULAS NORMAIS (E10) E NEOPLÁSICAS (E9) DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS.

Os resultados obtidos através da leitura espectrofotométrica por absorbância indicaram uma diminuição expressiva no número de células cancerosas nos cultivos expostos ao óleo de *Copaifera reticulata Duke*, quando comparados aos resultados observados nos cultivos de células normais E10. O valor da IC50 calculado para a linhagem neoplásica murina E9 foi 0,05µl/ml enquanto a linhagem murina normal E10 apresentou IC50 igual a 0,15 µl/ml. O gráfico 1 representa a viabilidade celular de E9 e E10 encontradas através da espectrofotometria (absorbância).

Gráfico 1 - Testes de viabilidade celular realizados por espectrofotometria de absorvância para cálculo de IC50 de células de linhagens murinas E9 e E10



Fonte: (RANIERI, T. 2015)

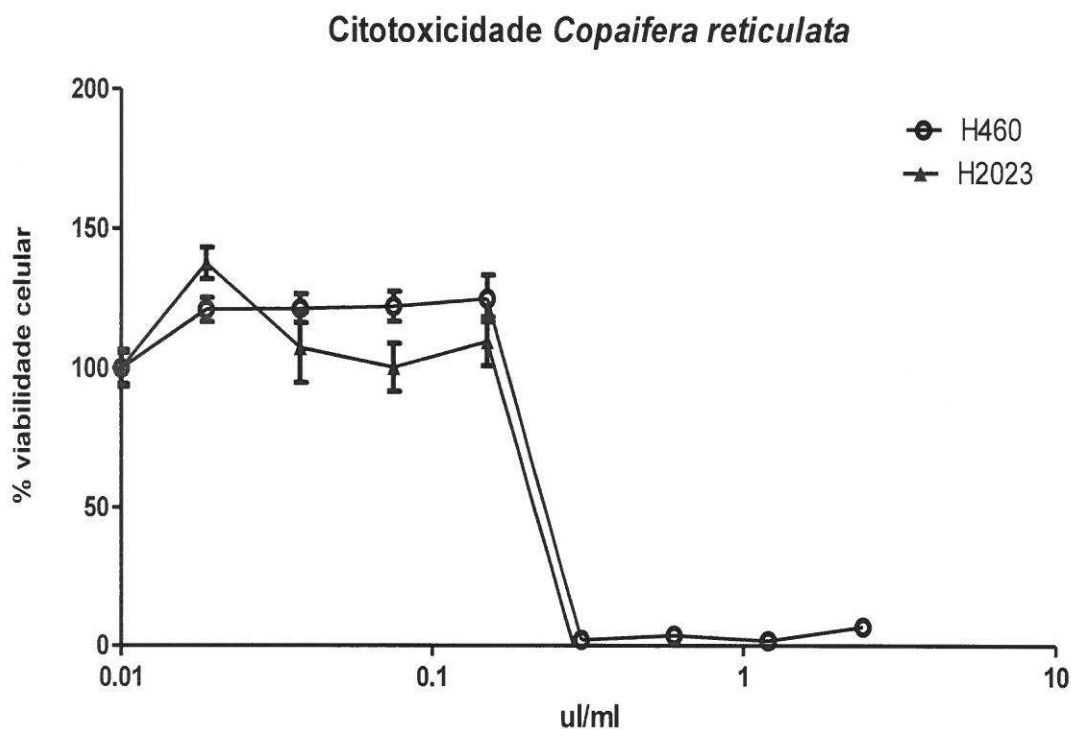
6.3. VALIDAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO ÓLEO DA *COPAIFERA RETICULATA DUCKE* EM LINHAGENS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DO PULMÃO HUMANO DOS TIPOS NCI-H460 E NCI-H2023.

Observou-se diminuição significativa no número de células cancerosas nos cultivos expostos ao óleo de *Copaifera reticulata Duke* nas duas linhagens de células de pulmão humano estudadas.

A exposição ao óleo foi eficaz na redução dessas células em quatro das oito concentrações estudadas como está representado no gráfico 2. Foi possível determinar que o OCR teve efeito semelhante nas duas linhagens de células cancerosas humanas estudadas.

Para a célula H460 a IC50 calculada foi 0,32 µl/ml e para a célula H2023 a IC50 calculada foi 0,17µl/ml.

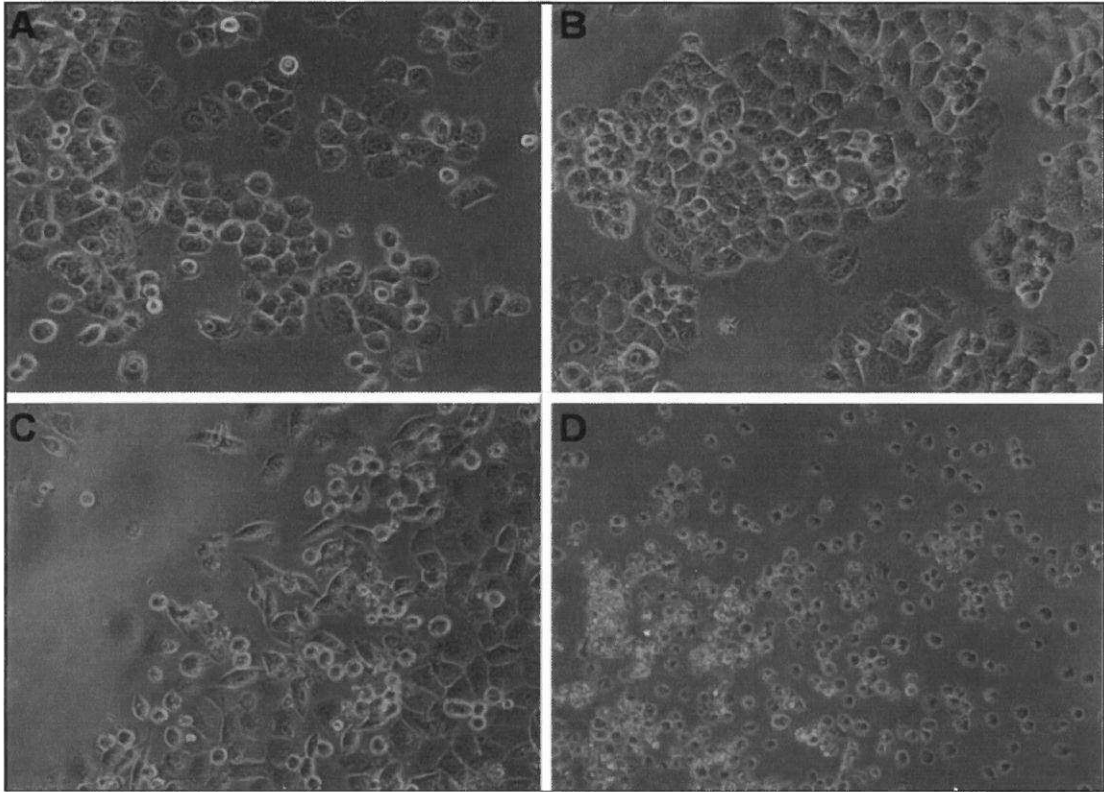
Gráfico 2 - Testes de viabilidade celular realizados por espectrofotometria de absorvância para cálculo de IC50 de células de linhagens H460 e H2023



Fonte: (RANIERI, T. 2015)

A figura 1 retrata células da linhagem H460 em cultivo após 24 horas. Mostra o crescimento celular, comparado ao controle, após o tratamento com o óleo de *Copaifera reticulata* Duke (OCR) nas concentrações de 0,075µl/ml, 0,30µl/ml e 0,60µl/ml. No quadrante (A) observa-se as células que cresceram no controle após 24 horas, em (B) o crescimento celular após o tratamento com o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke na concentração 0,075µl/ml, onde observou-se uma discreta redução no tamanho das células. Ainda na figura 1 observa-se em (C) e (D), células que receberam tratamento nas concentrações 0,30µl/ml e 0,60µl/ml respectivamente. Apresentam células de formas distintas entre si e diferentes ainda das células do controle.

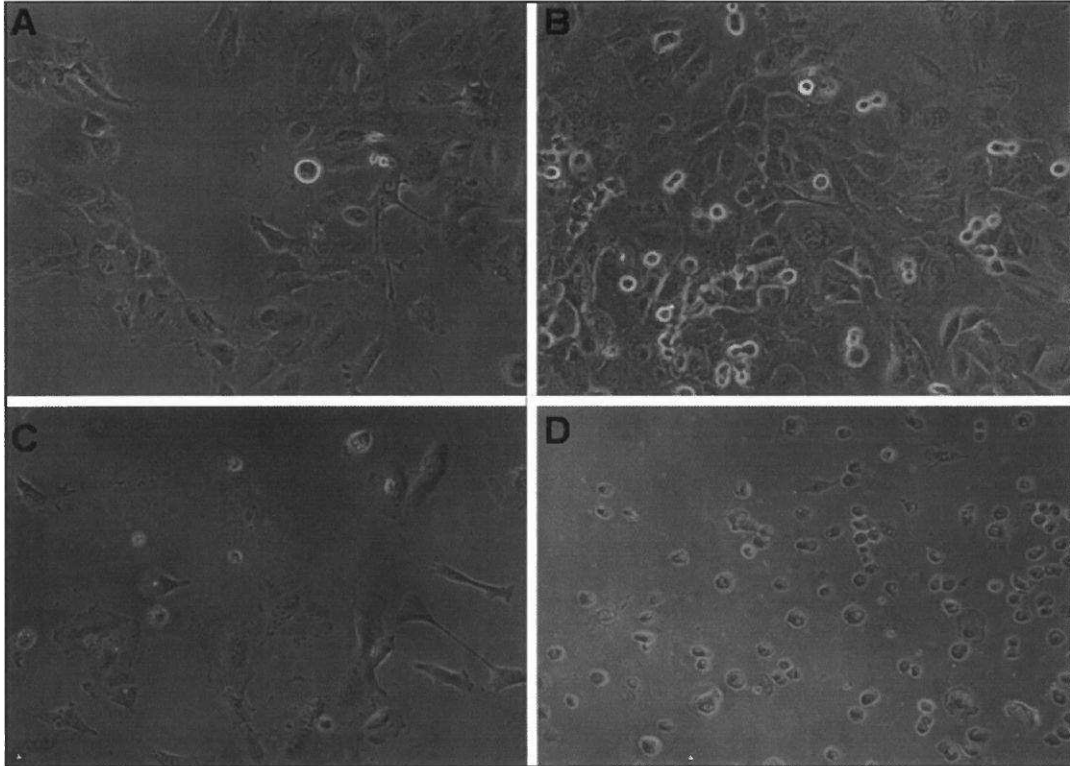
Figura 1 - Células de linhagem H460 tratadas com diferentes concentrações de *Copaifera reticulata* Ducke. Em A observa-se o controle após 24 horas, em B observa-se a exposição das células à concentração 0,075 μ l/ml, em C o crescimento celular na concentração 0,30 μ l/ml e em D observa-se as células expostas a concentração de 0,60 μ l/ml



Fonte: (RANIERI, T. 2015)

O desenvolvimento da linhagem de células H2023 está representado na figura 2. O quadro A refere-se ao controle após 48 horas de cultivo. Os quadros B, C e D fazem referência ao crescimento celular da H2023 nas diferentes concentrações de exposição ao óleo de *Copaifera reticulata* Ducke após as mesmas 48 horas. Em B representou-se a diluição de 0,037 μ l/ml, em C 0,30 μ l/ml e 0,60 μ l/ml foi a concentração de exposição utilizada em D. As células H2023 também apresentaram alterações em sua forma, quando comparadas ao controle, mesmo nas menores concentrações do óleo como pode ser observado no quadro B.

Figura 2 - Células de linhagem H2023 tratadas com diferentes concentrações de *Copaifera reticulata* Ducke. Em A observa-se o controle após 48 horas, em B observa-se a exposição das células à concentração 0,037 μ l/ml, a menor diluição estudada, em C o crescimento celular na concentração 0,30 μ l/ml e em D observa-se as células expostas a concentração de 0,60 μ l/ml



Fonte: (RANIERI, T. 2015)

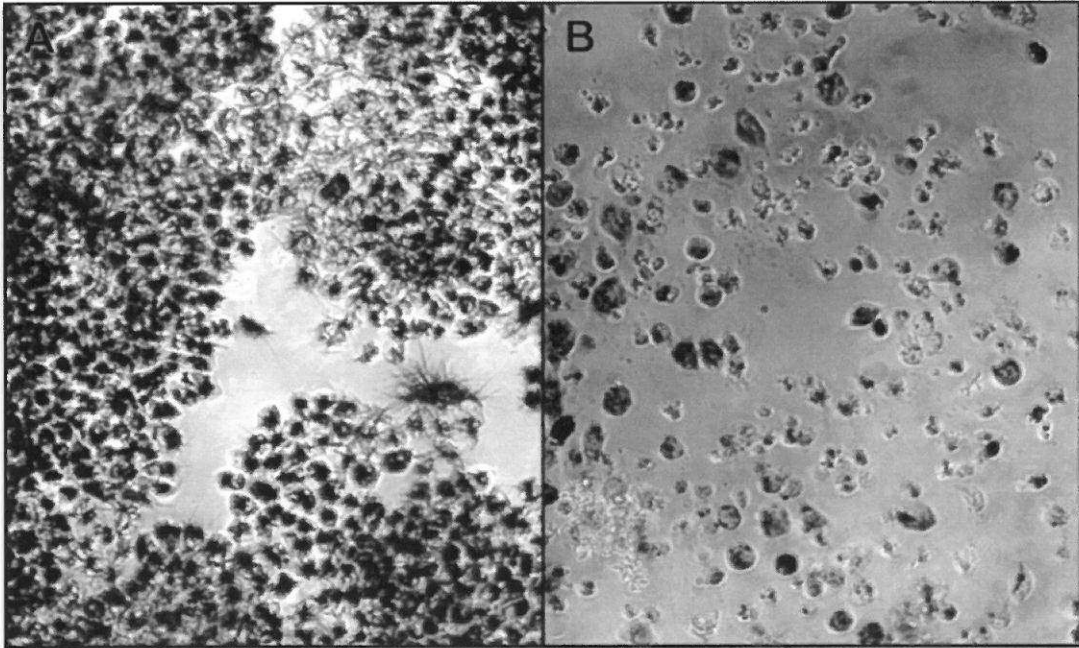
A figura 3 representa a conversão do MTT nas células H460 onde, no quadro A observa-se o controle e em B as células expostas ao tratamento na concentração de 0,30 μ l/ml. A tabela 1 apresenta as concentrações das IC50 de cada uma das células estudadas.

Tabela 1- Valor da IC50 encontrado para as células murinas E9 e E10 e para as células neoplásicas do pulmão humano H460 e H2023

Células	E9	E10	H460	H2023
IC50	0,0513	0,1581	0,3191	0,1651

Fonte: (RANIERI, T. 2015)

Figura 3 - Representa a reação de MTT em células neoplásicas tipo H460 após 3 horas. Em A observa-se os cristais de formazan nas células, sua morfologia, intensidade e coloração e em B observa-se alterações nas células expostas ao OCR na concentração de 0,30µl/ml

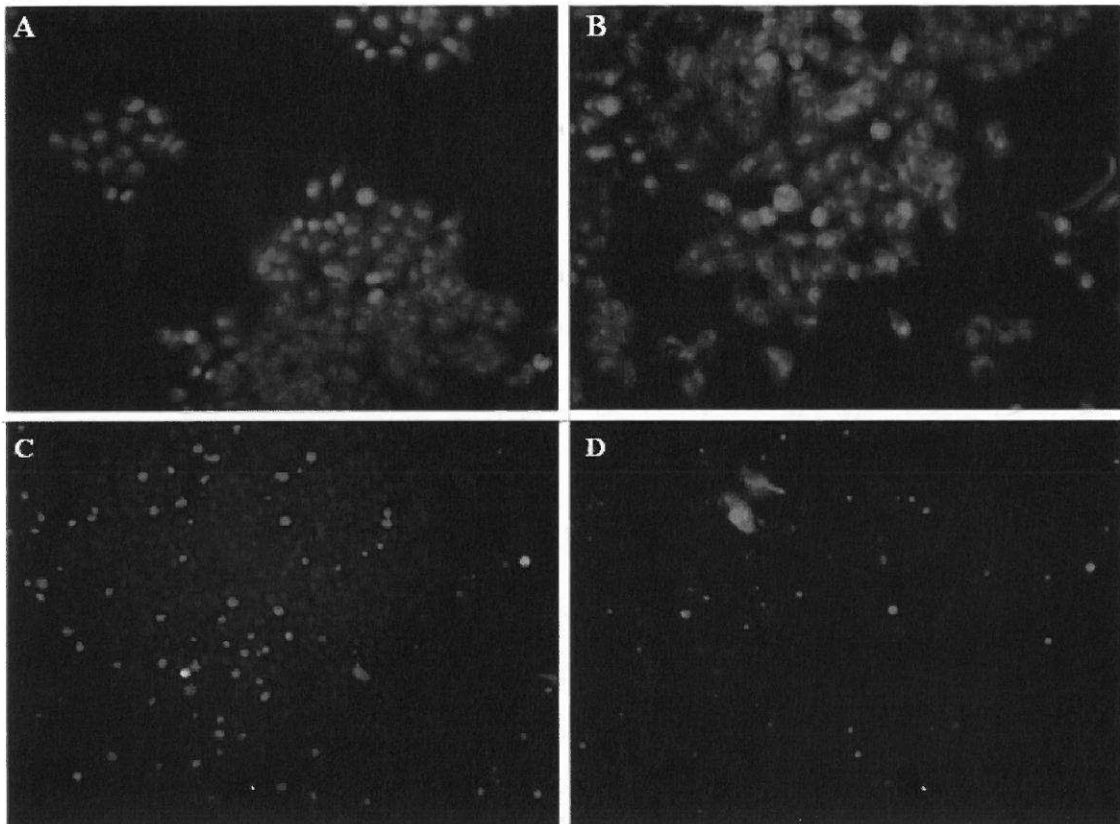


Fonte: (RANIERI, T. 2015)

6.4. ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO ÓLEO DA *COPAIFERA RETICULATA DUCKE* EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS DO PULMÃO HUMANO DE LINHAGEM NCI-H460 ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE POR FLUORESCÊNCIA.

Na seleção de imagens da figura 4, é possível perceber a ação do tratamento *in vitro* nas diferentes concentrações do OCR estudadas sobre as células cancerosas do pulmão humano. Observa-se a diferença na coloração, na quantidade e na morfologia das células H460.

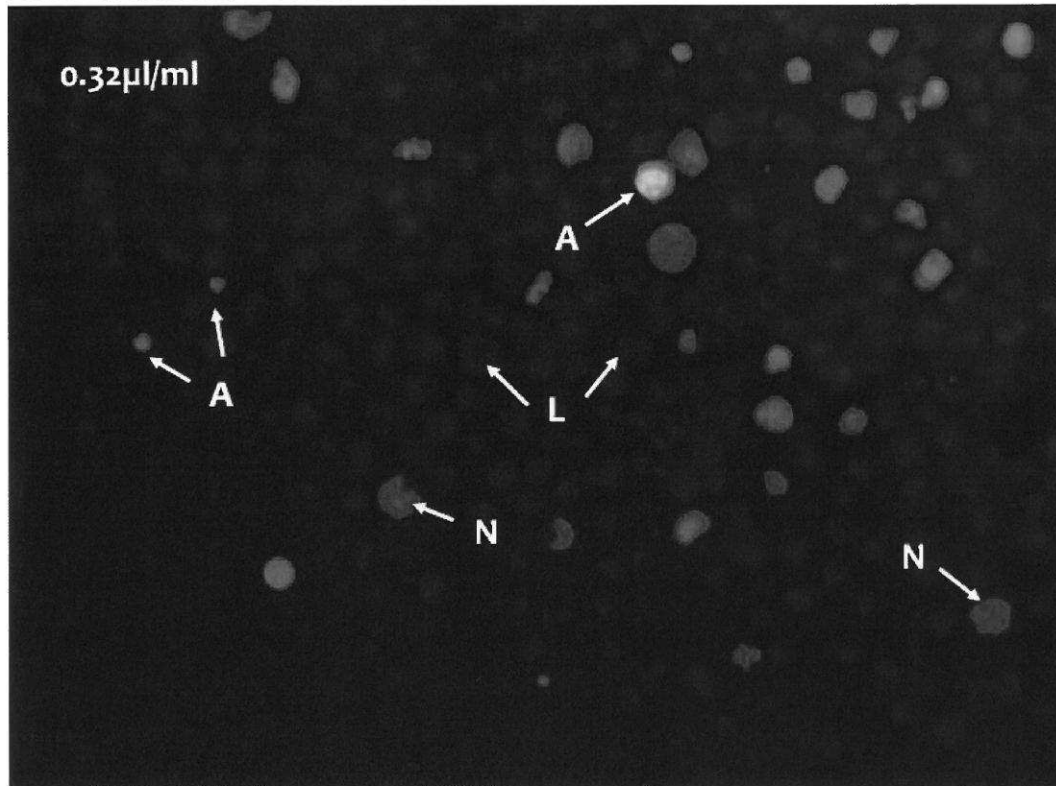
Figura 4 - Quantificação de apoptose por fluorescência através do Laranja de Acridina e do Brometo de Etídio, onde A representa o controle; em B observa-se a concentração 0,16 μ l/ml; em C encontra-se a IC50, de concentração 0,32 μ l/ml e em D a concentração 0,64 μ l/ml



Fonte: RANIERI, T. 2015

A figura 5 evidencia a fluorescência, exemplificando as estruturas como foram identificadas e contadas para a caracterização celular realizada nesse estudo de quantificação de apoptose

Figura 5 - Células de linhagem H460 tratadas com óleo de *Copaifera reticulata Ducke* na concentração de $0,32\mu\text{l/ml}$ (IC50). As setas evidenciam as características morfológicas utilizadas para a contagem das células e a quantificação de apoptose. Onde, A são células apoptóticas, N células necróticas e L células vivas.

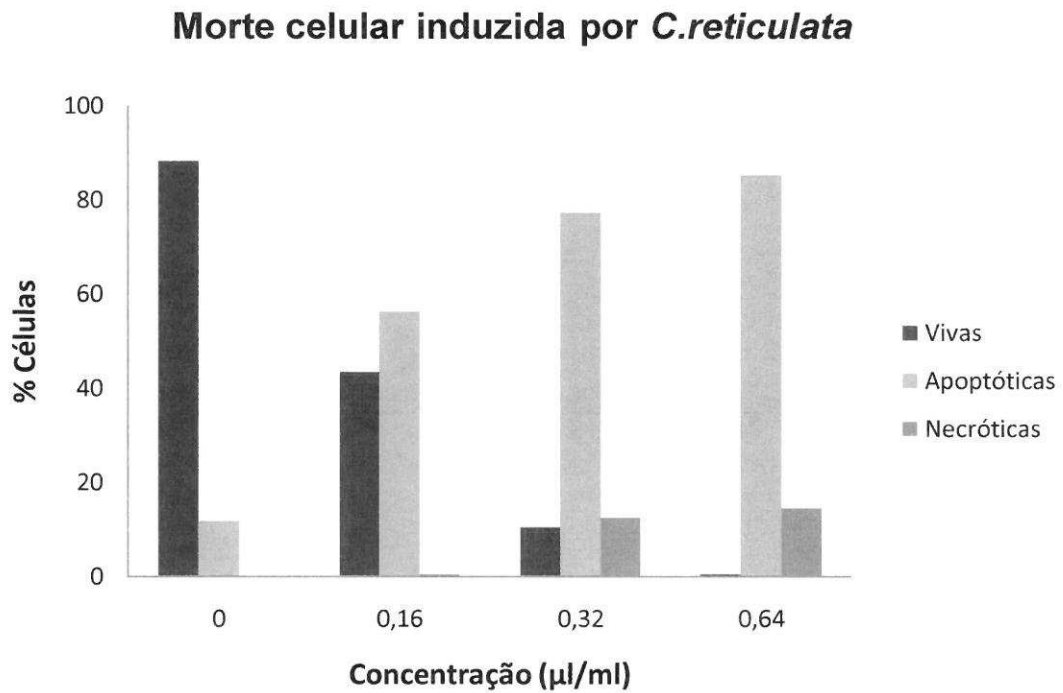


Fonte: (RANIERI, T. 2015)

Após a contagem de 1×10^3 células do controle e de cada uma das concentrações avaliadas, foi possível observar o efeito apoptótico promovido pelo óleo de *Copaifera reticulata Ducke* sobre as células cancerosas do pulmão humano da linhagem H460.

A contagem ocorreu por campo nas imagens de fluorescência com base na morfologia, tamanho e coloração nuclear das células e está representado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Quantificação de apoptose através da fluorescência por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). Representação gráfica da contagem de 1×10^3 células do controle e das 3 diferentes concentrações avaliadas



Fonte: RANIERI, T. 2015

Foi possível observar alterações celulares significativas em cada uma das diferentes concentrações estudadas.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antineoplásicos do OCR em experimento *in vitro* na intenção de determinar o seu potencial citotóxico por exposição de células pulmonares, murinas e humanas, não neoplásicas e neoplásicas bem como determinar o modo de ação do efeito citotóxico.

Observou-se efeito antineoplásico dose dependente do OCR através de sua exposição no cultivo dessas células. Evidenciou-se a diminuição da viabilidade celular em todos os cultivos por conversão de MTT e leitura espectrofotométrica, sendo menor na linhagem normal E10. Como a atividade antitumoral e antineoplásica de outras espécies de *Copaiferas* foram atribuídas aos diterpenos encontrados na porção resina (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; LIMA et al., 2003) e também a componentes antiinflamatórios da fração volátil (LIMA et al., 2003), optou-se por avaliar a ação antineoplásica do OC sem dissociá-lo, ou seja, utilizando-o como foi obtido na natureza. Os resultados encontrados por Lima et al (2003) em estudo *in vitro* sobre a ação do óleo da *Copaifera multijuga* realizado através de teste de viabilidade celular MTT, corrobora com os nossos resultados encontrados a partir do uso do mesmo método. O óleo *in natura* que utilizamos foi de outra espécie de Copaíba e também apresentou diminuição significativa no número de células viáveis após a exposição ao óleo, sugerindo que a ação pode não estar relacionada somente aos diterpenos, uma vez que esses avaliados isoladamente não apresentaram a mesma eficiência do óleo (LIMA et al., 2003; PEDREIRA, 2007; CHICARO, 2009). A apoptose foi quantificada por fluorescência e observada nas amostras de células neoplásicas do pulmão humano em todas as concentrações do OCR estudadas, aumentando com a concentração das doses até observarmos um aumento das de necroses (gráfico 3). Foi possível estabelecer a IC50 de todas as amostras, sendo que entre as linhagens murinas, a linhagem normal de células do pulmão de camundongo apresentou maior resistência ao OCR, necessitando de uma concentração 3 vezes maior que as células neoplásicas para o mesmo efeito (Tabela 1).

Além da diminuição do número de células neoplásicas nos cultivos, foi possível observar alterações na morfologia das células neoplásicas, que se tornaram mais alongadas, mesmo nas menores concentrações do OCR.

Nos dias atuais, acreditamos que o tratamento do câncer tenha evoluído significativamente, principalmente no que se refere a terapias convencionais, alternativas, diagnóstico precoce e prevenção. Ainda apresenta dificuldades diversas devido à complexidade dessa patologia, como a resistência a múltiplas drogas, principalmente quando os pacientes se encontram em condições avançadas (BOTELHO et al., 2013).

No presente estudo, optou-se pela utilização do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke (OC) por esta espécie ser exclusiva do Brasil, abundante na floresta Amazônica, nordeste e centro-oeste do país (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002), produzir mais óleo que as outras espécies de Copaíba (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006), por sua ampla e histórica utilização *in natura* como antitumoral de modo empírico pela população (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007; SACHETTI et al., 2011) e principalmente por possuir mais ácido caurenóico em sua composição que as outras espécies de *Copaiferas* conhecidas, composto da resina com elevada quantidade de diterpenos cauranos, clerodanos e labdanos (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Nos estudos realizados por Ohsaki et al (1994) uma substância antitumoral extremamente potente chamada (-)-colavenol foi isolada a partir do óleo de uma das espécies de Copaíba encontradas no Brasil (*Copaifera langsdorffii*) e satisfatoriamente testada *in vivo*, com efeito antitumoral contra carcinoma mamário invasivo aumentando a expectativa de vida de ratos avaliados, sendo que foi o dobro da expectativa dos ratos que receberam quimioterápico comercial *5-fluorouracil* (5-FU).

Veiga et al (2002) explicam que devido às semelhanças botânicas entre as espécies existem muitas contradições e equívocos na literatura específica, principalmente na identificação dessas espécies. Entre os sesquiterpenos normalmente encontrados em sua composição, o beta-cariofileno (β -cariofileno), muito rico em fenóis e reconhecidamente um potente antiinflamatório (VEIGA JUNIOR et al., 2007; LEANDRO et al., 2012) foi citado como anticarcinogênico e antioxidante (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

A fração dos diterpenos é bastante variada entre as espécies, sendo os diterpenos cauranos mais abundantes na *Copaifera reticulata* Ducke (VEIGA JUNIOR et al., 2007; EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014) fato que a diferencia de outras espécies estudadas para aplicação em quimioterapia como a *C. langsdorffii* observada por

Ohsaki (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994) e Senedese et al (2013) e a *C. Multijuga* estudada por Lima et al (2003). Essa foi uma das principais considerações para a escolha do óleo dessa espécie para esse estudo.

Lima (2003) estudou o óleo de *Copaifera multijuga* natural, reconstituído e também as frações de diterpenos e sesquiterpenos encontrados por cromatografia gasosa e avaliados posteriormente de forma isolada. Nesse estudo o óleo da *C. multijuga* foi administrado a camundongos C57black/6 por gavagem e promoveu a redução do crescimento de linhagem de células de melanoma B16F10 injetadas no subcutâneo (LIMA et al., 2003). Através desse estudo, também foi possível observar uma redução significativa nas metástases de pulmão, as quais são incidentes nessa patologia. O experimento revelou que as frações isoladas não foram tão eficazes no tratamento desses melanomas quanto o óleo integral, seja natural ou reconstituído (LIMA et al., 2003).

Em outro estudo realizado recentemente com ratos Wistar machos, administrou-se por gavagem o extrato alcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* para avaliar seu efeito frente ao indutor de danos ao DNA 1,2 dimethylhydrazine e lesões pré-neoplásicas do colon (SENEDESE et al., 2013). O extrato de folhas promoveu uma diminuição considerável na frequência de danos no DNA quando comparado ao controle positivo do mesmo. Observou-se também uma relevante diminuição nas criptas aberrantes (SENEDESE et al., 2013). Sugeriu-se então que a planta tivesse um potencial quimiopreventivo o que foi comprovado em experimentos *in vitro* anteriores com a redução de células viáveis (Cavalcanti et al., 2006; Senedese et al., 2013).

Pesquisadores orientais conseguiram isolar uma substância extremamente potente na ação antitumoral a partir do óleo da *Copaifera langsdorffii*, uma outra planta brasileira. Essa substância foi identificada como (-)-colavenol, um diterpeno (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994). A validação de sua ação antitumoral foi realizada no tratamento de Carcinomas Mamários Invasivos (IMC) em camundongos. O (-)-colavenol aumentou a vida dos animais em duas vezes quando comparado a quimioterapia de eleição feita por 5-fluorouracil (OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, 1994).

Embora alguns autores atribuam características distintas aos extratos de cascas do tronco, de folhas e ao óleo *in natura*, é sabido que cada um deles já demonstrou eficácia antitumoral em estudos anteriores (OHSAKI A, YAN LT,

SHIGERU I, ATSUGI H, 1994; LIMA et al., 2003; PEDREIRA, 2007; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; GOURINENI et al., 2011; SENEDESE et al., 2013).

Por ser o óleo uma porção tão nobre da árvore servindo para sua defesa (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2007; SACHETTI et al., 2011) merece atenção especial, não só por seus componentes e substâncias ativas. A verificação de fenóis e ação antioxidante ainda não foram atribuídas ao óleo como foram aos extratos de folhas e cascas (VEIGA JUNIOR et al., 2007) sendo um novo caminho para investigação.

Alguns pesquisadores (EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014) encontraram no óleo de *Copaifera reticulata*, através de estudos físico-químicos, características interessantes para a indústria farmacêutica como a viscosidade, a fluidez, o índice de acidez, que variou de 9,62 a 10,17mg de KOH/g e o índice de saponificação, que variou de 109,84 a 100,63mg de KOH/g (EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, 2014).

O ácido caurenóico encontrado na *Copaifera langsdorffii* apresentou atividade promotora de dano ao DNA em linhagem de fibroblastos (células V79) de hamsters (CAVALCANTI et al., 2006) enquanto o experimento que tratou tumores de Walker 256 com óleo de *Copaifera officinalis* não obteve alterações relevantes na imunohistoquímica das amostras (BOTELHO et al., 2013). Há claramente uma necessidade em se conhecer a particularidade dos produtos das diferentes espécies de Copaibas e suas composições, para uso medicinal e popular, estreitando o conhecimento da forma de aplicação, dose e o tempo de exposição.

O óleo de *Copaifera sp* apresentou uma potente ação de inibição da proliferação e a indução da apoptose em linhagem de células de carcinoma epidermoide de orofaringe (FaDu) (CHICARO, 2009), como ocorreu em nosso experimento com linhagens de células neoplásicas do pulmão humano (H460 e H2023) e murinas de pulmão (E9 e E10). Em estudo anterior para avaliação de efeitos genotóxicos da Copaíba em ratos Swiss saudáveis como o realizado por Almeida et al (2012), utilizou-se um óleo comercial de *Copaifera sp*, e também suas frações que foram analisadas por cromatografia gasosa. O tratamento ocorreu com a administração oral por gavagem de dose única que variou de 500mg/kg a 2000mg/kg, verificando-se que não houve danos ao DNA ou efeitos mutagênicos nos animais, portanto o óleo comercial de Copaíba avaliado nesse estudo e suas

frações não promoveram alterações genotóxicas nos animais avaliados, resultado que corrobora com o nosso experimento realizado com células murinas normais E10, as quais apresentaram pouquíssima variação morfológica e maior resistência à exposição de diferentes concentrações do OC.

Chicaro (2009) em um estudo com células de carcinoma epidermóide bucal, expostas e não expostas ao OC, avaliou por Western-Blot e imunofluorescência a expressão do complexo protéico fator nuclear-kappa-beta (NF- κ β) sabidamente relacionado à inflamação, estresse e injúrias, mas que também pode, em algumas situações, proteger as células da morte, agindo como uma proteína anti-apoptótica (GHOSH; MAY; KOPP, 1998). A autora observou uma potente ação do óleo de Copaíba relacionada à indução de apoptose por teste Tunel, fato que confirma os resultados também encontrados no nosso estudo realizado com metodologia distinta, onde usamos a fluorescência por BE e LA para essa quantificação.

No estudo de Senedese et al (2013) há indícios de que o OC possa proteger os organismos da carcinogênese como aconteceu em processo experimental. A quimioprevenção se faz através de recursos naturais, biológicos, químicos e sintéticos, para reverter, suprimir e prevenir a carcinogênese (GOURINENI et al., 2011). Estudos com outras plantas medicinais se fazem necessários visto que a *Copaifera reticulata* Ducke é apenas uma das espécies encontradas na grande biodiversidade brasileira com potencial antineoplásico.

Como explicaram os pesquisadores Simões et al (2010) espécies como as Copaibas estão presentes apenas nas florestas primárias ou secundárias bem desenvolvidas, ou seja, maduras, e são chamadas de climácicas o que torna seu cultivo convencional muito difícil. Sendo assim, esses autores explicam que há necessidade em se preservar as florestas nativas para que essas árvores sejam manejadas em seu ecossistema natural.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Observou-se nesse estudo que o OC promoveu efeito citotóxico sobre as células neoplásicas oriundas de carcinomas pulmonares humanos e também sobre a linhagem neoplásica murina E9, no entanto apresentou menor efeito citotóxico em célula murina normal E10, Há necessidade de outros estudos com o OC para encontrar respostas que embasem os resultados da espectrofotometria por absorbância bem como os resultados positivos obtidos na quantificação de apoptose por fluorescência. A sequência dessa investigação é encontrar a forma de ação do OC e entender seu efeito antineoplásico.

A quantificação de apoptose foi realizada por contagem de células pela fluorescência através dos reagentes corantes Brometo de Etídio (BE) e Laranja de Acridina (LA). Mostrou-se eficiente e representativa na comparação entre o controle e as amostras expostas ao OC, tornando-se uma opção para uma possível substituição da citometria de fluxo em avaliações preliminares, minimizando custos e promovendo experiência em microscopia de fluorescência.

A exposição ao OC promoveu alterações morfológicas nas células quando comparadas ao controle, bem como o aumento de células em apoptose e a diminuição de células vivas. Essas evidências foram baseadas nas colorações fluorescentes verde (LA) e laranja (BE), indicadoras da integridade da membrana celular e de características nucleares, principalmente morfológicas.

Uma possibilidade tão nobre para o OC precisa servir de alerta para a preservação da espécie, das florestas e de toda a biodiversidade conhecida e desconhecida. Mesmo com a existência de métodos de extração sustentável, a maior parte do óleo de *Copaifera sp* comercializado no Brasil e principalmente no exterior é produto secundário, proveniente do corte indiscriminado das árvores da floresta tropical brasileira. Além da destruição desse ambiente e suas conseqüências naturais, essa prática facilita as fraudes e adulterações do óleo e dificulta a correta identificação das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSO-GOLDFARB, A. M.; FERRAZ, M. H. M.; BELTRAN, M. H. R. Substitutos do “novo” mundo para as antigas plantas raras: um estudo de caso dos bálsamos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1620–1626, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700035&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. A. C.; HERNANDES, L. C.; DE SOUZA RAMOS, M. F.; ANTUNES, L. M. G.; DE FREITAS, O. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 664–672, 2012.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- BASILE AC, SERTIÉ JA, FREITAS PC, Z. A. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. **J Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–109, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3352280>>.
- BOTELHO, N. M.; CORRÊA, S. C.; LOBATO, R. C.; TEIXEIRA, R. K. C.; QUARESMA, J. A. S. Immunohistochemistry of the uterine cervix of rats bearing the Walker 256 tumor treated with copaiba balsam. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 28, n. 3, p. 185–9, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000300005>>.
- BULLITTA, S.; PILUZZA, G.; VIEGI, L. Plant resources used for traditional ethnoveterinary phytotherapy in Sardinia (Italy). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 7, p. 1447–1464, 18 abr. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10722-006-9130-4>>. Acesso em: 23 abr. 2014.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, n. SUPPL. 1, 2000.
- CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388–392, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691505002541>>.

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.** 2009. USP, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72–9, 22 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009521>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

EDERLY SANTOS SILVA, CHARLES ROLAND CLEMENT, V. F. da V. J.; VANDERSON BANDEIRA DA SILVA, N. R. M. N. **ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO-RESINA DE C. RETICULATA DIRECIONANDO UM PLANEJAMENTO AMBIENTAL E COMERCIAL.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2014/XI-006.pdf>>.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2117903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 maio. 2014.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305–310, abr. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2008000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 abr. 2014.

FUKUMASU, H.; DA SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; DE LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; DE SOUZA SPINOSA, H.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer letters**, v. 233, n. 1, p. 158–64, fev. 2006.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 225–260, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>>.

GOURINENI, V. P.; VERGHESE, M.; BOATENG, J.; SHACKELFORD, L.; BHAT, K. N. Chemopreventive potential of synergy1 and soybean in reducing azoxymethane-induced aberrant crypt foci in fisher 344 male rats. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2011, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2011/983038>>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. de S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; DA SILVA, J. A.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 4, p. 3866–89, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466849>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

LIMA NETO, J. de S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1078–1080, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 abr. 2014.

LIMA, S. R. M.; VEIGA, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>.

MESQUITA, M. L. De. Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica. 2009. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Documents/Mendeley/2009_MarianaLaundrydeMesquita.pdf>.

MORAES, M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Screening for Anticancer Activity of Plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 3, p. 235–239, 1997. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2756300>>. Acesso em: 24 jul. 2015.

OHSAKI A, YAN LT, SHIGERU I, ATSUGI H, I. D. and K. Y. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpene from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889–2892, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X01808349>>.

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

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102–107, mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000100019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 17 mar. 2014.

PADILHA, P. D. C.; PINHEIRO, R. D. L. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 251–260, 2004. Disponível em: <www.inca.gov.br/Rbc/n_50/v03/pdf/REVISAO3.pdf?>.

PEDREIRA, E. N. **Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (copaifera reticulata) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental dmba induzida**. 2007. Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=466988&indexSearch=ID>>.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 abr. 2014.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC biotechnology**, v. 5, p. 12, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

SACHETTI, C. G.; DE CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Developmental toxicity of copaiba tree (Copaifera reticulata Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 5, p. 1080–5, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266184>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (Copaifera reticulata Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937–941, dez. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000600025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 17 mar. 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ed. Editoras UFRGS/ UFSC. Porto Alegre e Florianópolis, 2010. 1102p.

SENEDESE, J. M.; ALVES, J. M.; LIMA, I. M. D. S.; DE ANDRADE, E. A. P.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 3, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3606370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SPINOLA, A. V.; MANZZO, I. de S.; ROCHA, C. M. da. As relações entre exercício físico e atividade física e o câncer. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1 (Versão impressa): 1677-1028, p. 39–48, 2007. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92960105>>.

SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006. 862p

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 7, p. 537–43, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094240>>. Acesso em: 21 maio. 2014.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768–80, out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570043>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

VASCONCELOS, A. F. F. de; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1057–1060, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000700002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero copaifera L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, maio 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 17 mar. 2014.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–54, 13 jun. 2007a. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/929/92960105.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

WHO. **Traditional Medicine Strategy**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.PDF>.

WHO/IUCN/WWF. **WHO/IUCN/WWF Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants**.