UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PÚBLIO SANTOS DOMINGUES

Estudo do efeito antitumoral do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo

São Paulo

2017

PÚBLIO SANTOS DOMINGUES

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Heidge Fukumasu

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3450
FMVZ

Domingues, Públio Santos

Estudo do efeito antitumoral do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo. / Públio Santos Domingues. -- 2017.
118 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu.

1. Copaíba. 2. Ácidos Graxos. 3. Apoptose. I. Título.

Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético

O óleo de copaíba utilizado neste trabalho foi cedido pelo Prof. Dr. Osmar Alves Lameira e possui o registro no Herbário Embrapa Amazônia Oriental (Exsicata 183939) na cidade de Belém, estado do Pará cujo Banco de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas está credenciado como fiel depositário junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético-CGEN por meio do aviso de credenciamento No. 034/2010/SECEX/CGEN publicado no D.O.U. Nº 189, de 01/10/2010, Seção 3, página 183, bem como, o Projeto:

"Coleta, conservação, caracterização, documentação e uso de plantas medicinais e aromáticas de ocorrência na Amazônia Oriental".

Autorização de acesso para fins de Pesquisa Científica - Processo 02001.010413/2009-64 da inclusão de projetos na Autorização Especial de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético junto ao IBAMA.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DOMINGUES, Públio Santos

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, minha família e
companheiro, que com muito amor e
compreensão me auxiliam a tornar-me uma
pessoa melhor à cada dia! Nada neste
mundico de Deus seria tão importante para
mim quanto todos vocês...*

AGRADECIMENTOS

É muito complicado num momento como esse, deixar passar despercebido as pessoas que fizeram a diferença em nossos caminhos. Peço desculpas àqueles os quais não cito aqui, mas saibam todos vocês, amigos de jornada, que de alguma forma minha vida não seria até agora a maneira que tem sido se não fosse pela existência de vocês!

Muito obrigado a todos da minha família!

Em especial, agradeço infinitamente ao meu pai Sílvio Cássia Domingues, que mesmo diante de muitas dificuldades se fez presente em cada pedacinho deste trabalho... me proporcionando tudo o que pôde para que eu tivesse capacidade de depositar nos estudos o melhor de mim! Por compartilhar suas experiências e me deixar viver um pouquinho de cada uma delas! Te amo sem tamanho!

Agradeço a mais linda do meu coração, Meire Santos Domingues. Ah! Como amo você minha mãe! Sua espontaneidade te fazem ser a mulher forte e autêntica que és! Seu modo de viver a vida é um exemplo para mim todos os dias! Sem o seu companheirismo e amor, tudo seria mais difícil! Agradeço a Deus por tê-la como minha mãe! Te amo!

Aos meus irmãos Pablo Santos Domingues e Rívian Santos Domingues de Sousa! Vocês são tudo! Sem palavras para expressar exatamente o que sinto, mas sou muito grato por estarem ao meu lado, irmãos mais velhos que sempre foram muito atentos comigo em tudo! Aos meus cunhados Meyre e Denis também são parte desta família e estão sempre juntos conosco nesta batalha.

Às minhas sobrinhas Luisa e Isabela que a partir de agora vão dominar nossa atenção! E aos bebezinhos que estiverem por engrandecer essa família! Que todo o esforço do meu trabalho seja de vocês!

Aos meus amigos sul-americanos, mexicanos, sul-africanos, sauditas, europeus e todos de tantos lugares que vivi e passei... agradeço pelas experiências

de vida que ganhei, tendo o privilégio de conhecê-los e viver de cada um sua cultura, costumes e saberes.... Todos me fizeram enriquecer como pessoa!

Agradeço aos amigos, professores (Valerinha, Tojal, Marcelo, Josi, Lídia, Glauco), funcionários e coordenadores dos lugares onde estudei e em especial aos do Centro Acadêmico Anhanguera de Leme, que sempre confiaram no meu potencial como Médico Veterinário! A minha turma da graduação além das parceiras Izadora Ferreira Bittencourt, Lilian Alessandra Manesco, Tatiana Ranieiri e Carolina Pugliesi.

À minha querida amiga, colega de profissão, ex-professora e primeira orientadora Karina Médice Madureira, em quem pude confiar meus anseios e iniciar a vida acadêmica em 2011, com os primórdios e origem deste trabalho. Apesar da distância, nossa amizade nunca vai acabar! Agradeço a meu amigo e meu ex-orientador Heros José Máximo por ter me dado a oportunidade e um pouco do seu tempo para que eu alcançasse meus objetivos em buscas de novos caminhos.

Ao meu ex-professor e também ex-orientador José Augusto Senhorini pelo seu tempo e paciência gastos comigo. Em todo tempo, tudo foi muito bom! Aos queridos Luís Alberto Gaspar, Maria Rita de Cássia Barreto Netto, Rita de Cássia Gimenes de Alcântara Rocha e Tatiana Mira pela força e coragem em mim depositados. Ao meu amigo e também ex-orientador Júlio Cesar Cenci de Aguiar pelas boas conversas e a todos os demais da equipe do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (Cepta / ICMBio).

Agradeço com muito apreço a professora Prof^a. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira e a todos os técnicos e alunos do Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da FZEA-USP; em especial a amiga Naila Albertina de Oliveira, que com muito carinho e parceria me ajudou e muito em parte do desenvolvimento deste trabalho. Muitíssimo obrigado!

Ao Prof. Dr. Edson Roberto da Silva pela colaboração no desenvolvimento das análises que procedi neste trabalho. Pela paciência da Técnica de Laboratório

Lindsay Baltel Paskoski e de todos os seus alunos do Laboratório de Imunologia de Parasitas (LIP) da FZEA-USP.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles, por conceder e compartilhar o espaço físico do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da FZEA-USP e à todos os amigos que lá eu fiz!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Heidge Fukumasu, por aceitar desde o estágio obrigatório e permitir até hoje a minha presença no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT); por compartilhar de seu precioso tempo e me instigar o quanto possível para melhorar meu desempenho.

À Yonara, Pâmela, Francisco, Pedro, Pedrinho e a todos os integrantes do LOCT. À todos do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) e da Secretaria de Pós Graduação. Lembrarei de todos sempre; aos inúmeros amigos que fiz na Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP).

A minha grande parceira e amiga Arina Lázaro Rochetti, que ao longo de minha experiência como aluno USP sempre esteve pronta para me ajudar e dividir seus conhecimentos... foi muito bom compartilhar este período contigo e disfrutar de bons momentos! Que Deus lhe abençoe sempre!

Ao amigo Nilton Pedro do Santos, técnico do Laboratório de Histologia e grande amigo! Obrigado por todas nossas conversas sinceras onde pude perceber o dom da paciência.

Ao meu companheiro Gilson Lima Vieira Filho, que do meu lado me dá forças e estímulos para correr atrás dos meus sonhos! Conto sempre contigo! Te agradeço de coração!

Às amigas Simone Godoi, Luciane Oliveira Carille Baldin e Beatriz Rodrigues Diberto pela força na DNAnimal! Nosso sucesso depende de nós mesmos! Obrigado por serem exemplo de coragem!

À Evadne Azeredo Will, a Sandra, funcionárias na Biblioteca Virginie Buff D'Ápice (FMVZ/USP) pelo auxílio nas correções das normas e diretrizes desta dissertação.

À todos os animais com que tive a oportunidade de conviver e aprender! Artista, Peralta, Juquinha, Jojota, Ariel, Lora, Pepeu, Sila, Pretinha, Zumi, Bruca, Átila, Még, Nina, Jolie, Bizu, Tábata, Lindy, Sebo, Asfalto, Laka, Cambuya e outros tantos com quem estive junto!!! Vocês me mostraram o valor do que sinto e o quanto eu amo minha profissão!

Finalmente agradeço à Deus, por me proporcionar a chance de agradecer quem torna minha vida mais afetuosa.

Para todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

“Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma
pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos”.
(Isaac Newton)

RESUMO

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.** [Study of the antitumor effect of *Copaifera reticulata* Ducke oil and its fraction on culture of epithelial lung cells of mouse]. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Recentemente o câncer de um modo geral, sobretudo o câncer de pulmão tem sido causa de grande preocupação no mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral do óleo (*Copaifera reticulata* Ducke) *in natura* e sua fração resina em linhagens celulares não cancerosas (E10) e cancerosas (E9) de pulmão de camundongo. O óleo foi submetido a hidrodestilação para a obtenção da fração resina. As células após o cultivo a 37°C foram tratadas com 8 diferentes concentrações do óleo e da resina, foram mantidas na mesma temperatura por mais 48h na estufa. Depois adicionou-se o reagente *Thiazolyl blue tetrazolium bromide* para o teste de citotoxicidade e determinação da concentração inibitória de 50% de células viáveis (IC50). Com os resultados, observou-se que ambos os tratamentos agiram como antitumorais e quando comparados entre si percebe-se que o óleo *in natura* agiu melhor que sua fração resina, sugerindo ser mais citotóxico para as células cancerosas a uma concentração aproximadamente onze vezes menor (E9 [0,0287µL/mL]) do que para as células não cancerosas (E10 [0,3142µL/mL]). A fração resina também inibiu a proliferação celular, na concentração E10 [0,0930µL/mL] e E9 [0,8002µL/mL]. Verificou-se através da técnica de fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio que os tratamentos induziram a morte das células por apoptose. Conclui-se que o óleo *in natura* da *C. reticulata* Ducke agiu melhor como agente antitumoral do que a resina, sugerindo que ocorre um sinergismo entre suas frações e que estudos futuros *in vitro* e *in vivo* são necessários para garantir a sua padronização e utilização.

Palavras-chave: Copaíba. Ácidos Graxos. Apoptose

ABSTRACT

DOMINGUES, P. S. **Study of the antitumor effect of *Copaifera reticulata* Ducke oil and its fraction on culture of epithelial lung cells of mouse.** [Estudo do efeito antitumoral do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo]. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In recent times cancer in general, especially lung cancer has been a cause of great concern in the world. The objective of this work was to evaluate the antitumor activity of the oil (*Copaifera reticulata* Ducke) *in natura* and its resin fraction in non-cancerous (E10) and cancerous (E9) lung cells lines of mouse. The oil was subjected to hydrodistillation to obtain the resin fraction. Cells after cultivation at 37°C were treated with 8 different concentrations of oil and resin, and were maintained at the same temperature for another 48h in the oven. The MTT reagent was then added for the cytotoxicity test and determination of the 50% viable cell inhibitory concentration (IC50). The results showed that both treatments acted as antitumor and when the data were compared it was observed that the oil *in natura* acted better than its resin fraction because it was more cytotoxic to the cancer cells at a concentration almost eleven times smaller (E9 [0,0287µL/mL]) than for non-cancer cells (E10 [0,3142µL/mL]). The resin fraction also inhibited cell proliferation, but at a very close concentration for the two cells line (E10 [0,0930µL/mL] and E9 [0,8002 µL/mL]). It was verified by the fluorescence technique with Acridine Orange and Ethidium Bromide that the treatments induced the death of the cells by apoptosis. It's concluded that the *in natura* oil of *C. reticulata* Ducke acted better as an antitumor than the resin, suggesting that synergism occurs between its fractions and that future *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to guarantee its standardization and use.

Keywords: Copaiba. Fatty Acids. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo em Homens e Mulheres.....	24
Figura 2. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo para Homens.	25
Figura 3. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo para Mulheres.....	25
Figura 4. Estimativa de novos casos e de mortes por câncer nos Estados Unidos em 2015.	26
Figura 5. Estimativa de novos casos e de mortes por câncer nos Estados Unidos para o ano de 2016.....	27
Figura 6. Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2014.	27
Figura 7. Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2016.	28
Figura 8. A área escura representa os lugares onde o gênero <i>Copaifera</i> é encontrado.....	34
Figura 9. Exemplar de <i>Copaifera</i> sp. no estacionamento da Biblioteca Central do Campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga.....	35
Figura 10. Florescência da <i>Copaifera</i> sp.....	36
Figura 11. Folhas, frutos e semente de exemplar de <i>Copaifera</i> sp.	36
Figura 12. Madeira da <i>Copaifera</i> sp.; seus canais secretores. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental, Cidade de Belém-PA).....	39
Figura 13. Perfuração do tronco com o trado tradicional (A); Localização dos furos e vedação com pvc (B) e Coleta do óleo (C, D). (Extração do óleo <i>C. reticulata</i> Ducke, sob registro no Herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental, Exsicata 183939).	40
Figura 14. Óleos da <i>Copaifera</i> sp.	41
Figura 15. Célula não tumoral de pulmão de camundongo (E10). Aumento 40x.....	59
Figura 16. Célula tumoral de pulmão de camundongo (E9). Aumento 40x.....	59
Figura 17. Teste de Solubilidade do óleo (<i>C. reticulata</i> Ducke).....	61
Figura 18. Hidrodestilação.	62
Figura 19. Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas. Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da FZEA-USP.	63
Figura 20. Esquema ilustrativo – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.	65
Figura 21. Esquema ilustrativo Teste de Citotoxicidade do óleo da <i>Copaifera reticulata</i> Ducke in natura e da fração resina.	67
Figura 22. Quantificação da Taxa de Apoptose pela Técnica de Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. Legenda: (A) células em apoptose, (L) células viáveis e (N) células em necrose.....	69
Figura 23. Esquema ilustrativo Quantificação de Apoptose pela Técnica de Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio das células tratadas com o óleo da <i>Copaifera reticulata</i> Ducke in natura e com a fração resina.	70
Figura 24. Mistura homogênea entre óleo e álcool etílico PA 1:2.....	72
Figura 25. Produto da Hidrodestilação.....	73
Figura 26. Cromatograma do Óleo de Copaíba.	74
Figura 27. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido caprilico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 94 %.....	75
Figura 28. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido cáprico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 96 %.	75

Figura 29. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido láurico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.	76
Figura 30. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido tetradecanóico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 96 %.	76
Figura 31. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido palmítico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.	77
Figura 32. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido esteárico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 95 %.	77
Figura 33. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido oleico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.	78
Figura 34. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido linolênico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 94 %.	78
Figura 35. Cultivo de células E10 tratadas com óleo de copaíba <i>in natura</i> , coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.	81
Figura 36. Cultivo de células E9 tratadas com óleo de copaíba <i>in natura</i> , coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.	82
Figura 37. Cultivo de células E10 tratadas com a fração resina do óleo da <i>C. reticulata</i> Ducke, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.	84
Figura 38. Cultivo de células E9 tratadas com a fração resina do óleo da <i>C. reticulata</i> Ducke, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.	85
Figura 39. Comparativo dos cultivos de células E10 tratadas com o óleo <i>in natura</i> .	88
Figura 40. Comparativo dos cultivos de células E9 tratadas com o óleo <i>in natura</i> .	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade por ensaio colorimétrico com MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide) das células E10 e E9 tratadas com óleo <i>in natura</i> (<i>C. reticulata</i> Ducke).	80
Gráfico 2. Avaliação da citotoxicidade por ensaio colorimétrico com MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide) das células E10 e E9 tratadas com a resina (<i>C. reticulata</i> Ducke). ...	80
Gráfico 3. Comparativo das Taxas de Apoptose (%) das Células E10 (A) e E9 (B) tratadas com óleo <i>in natura</i> da <i>C. reticulata</i> Ducke.....	83
Gráfico 4. Comparativo das Taxas de Apoptose (%) das Células E10 (A) e E9 (B) tratadas com a fração resina do óleo da <i>C. reticulata</i> Ducke.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes Sesquiterpênicos da <i>Copaifera</i> sp.....	43
Tabela 2. Componentes Diterpênicos da <i>Copaifera</i> sp.	43
Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do óleo de copaíba identificados em CG-MS e seus respectivos tempos de retenção e porcentagem dos compostos.	74
Tabela 4. Valores das IC ₅₀ (concentração inibitória) determinadas pelo Teste de Absorbância por ensaio colorimétrico com MTT.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categorização e classificação comercial da madeira obtida de árvores de copaíba.....	38
Quadro 2. Diferentes atividades biológicas testadas do óleo das espécies do gênero <i>Copaifera</i> sp.	45
Quadro 3. Ordem decrescente em porcentagem de compostos voláteis do óleo da <i>Copaifera reticulata</i> Ducke. Floresta Nacional do Tapajós. Exsicata: 183939 Herbário EMBRAPA Amazônia Oriental.	90
Quadro 4. Constituintes Diterpênicos do óleo da <i>Copaifera reticulata</i> Ducke da região da Floresta Nacional do Tapajós. Sob Registro 61212 no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.	91
Quadro 5. Ácidos Graxos e o Câncer.	92

LISTA DE SIGLAS

GC-MS – do inglês “Gas chromatography–mass spectrometry”

IC50 – concentração suficiente para inibir em 50% a proliferação celular, do inglês “inhibitory concentration”

IFN- γ – interferon gama

IL-17 – interleucina-17

MTT – do inglês “Thiazolyl blue tetrazolium bromide”

NO – óxido nítrico

NSCLC – do inglês “non small cell lung cancer”

PVC – policloreto de vinil

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SCLC – do inglês “small cell lung cancer”

TNF- α – do inglês “tumor necrosis factor alfa”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. O CÂNCER E A SUA RELEVÂNCIA.....	24
2.2. O CÂNCER DE PULMÃO	28
2.3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS E ERVAS MEDICINAIS	32
2.4. ÁRVORE DE COPAÍBA (<i>Copaifera</i> sp.).....	34
2.5. ÓLEO DE COPAÍBA	39
2.6. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS DE COPAÍBA (<i>Copaifera</i> sp.).....	43
2.7. INDICAÇÕES MEDICINAIS DO ÓLEO	45
2.8. <i>Copaifera reticulata</i> Ducke	50
3. OBJETIVOS.....	57
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1. ÓLEO DE COPAÍBA (<i>C. Reticulata</i> Ducke).....	58
4.2. LINHAGENS E ORIGEM DAS CÉLULAS	58
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	60
Experimento I	60
A. Teste de Solubilidade e pureza do óleo (<i>C. reticulata</i> Ducke)	60
B. Fracionamento por Hidrodestilação.....	60
C. Perfil dos Ácidos Graxos	60
Experimento II.....	60
A. Cultivo Celular	60
B. MTT (viabilidade celular).....	60
C. Morte Celular (taxa de apoptose).....	60
4.4. EXPERIMENTO I.....	60
4.4.1. TESTE DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA	60
4.4.2. FRACIONAMENTO DO ÓLEO POR HIDRODESTILAÇÃO	61
4.4.3. ANÁLISE DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	62
4.5. EXPERIMENTO II.....	65
4.5.1. CULTIVO CELULAR.....	65
4.5.2. TESTE DE CITOTOXICIDADE E ENSAIO COLORIMÉTRICO POR MTT	66
4.5.3. QUANTIFICAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE POR TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO	68
4.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71

5. RESULTADOS	72
5.1. EXPERIMENTO I.....	72
5.1.1. TESTE DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA	72
5.1.2. FRACIONAMENTO DO ÓLEO DE COPAÍBA POR HIDRODESTILAÇÃO.....	72
5.1.3. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	73
5.2. EXPERIMENTO II.....	79
5.2.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE E ENSAIO COLORIMÉTRICO POR MTT	79
5.2.2. TAXA DE APOPTOSE POR FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO.....	81
6. DISCUSSÃO.....	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

A oncologia é ciência que estuda as neoplasias e o termo câncer é o nome mais comum dado aos tumores malignos; sabe-se que a persistência deles pode resultar de alterações genéticas e epigenéticas que começam na progênie das células tumorais, possibilitando uma exagerada proliferação celular (ROBBINS; COTRAN, 2005; SARKAR et al., 2013).

Os tumores malignos e benignos apresentam características em comum como células neoplásicas em proliferação e estroma de sustentação formado por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos; os neoplasmas malignos por sua vez, possuem capacidade para invadir tecidos e órgãos adjacentes, além de metastatizar em locais distantes de seu ponto de origem (ROBBINS; COTRAN, 2005).

As características do câncer envolvem a capacidade biológicas que tumores adquirem durante o seu desenvolvimento, elas são de fato uma maneira de organização das complexidades da neoplasia, como a autossuficiência da sinalização proliferativa, a evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular e consequentemente imortalidade de suas replicações, indução de angiogênese, invasão e metástase, instabilidade genômica e inflamação (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Inúmeras moléculas químicas oriundas de fontes naturais são utilizadas nos tratamentos de diferentes enfermidades humanas, podem ser obtidas a partir de organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres e também de diferentes microrganismos e vegetais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). Os vegetais por sua vez são considerados as maiores fontes de substâncias ativas, pois algumas plantas são ricas em diversas estruturas metabólicas (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Por demonstrarem efeitos quimiopreventivos promissores, algumas plantas são utilizadas na produção de fitoterápicos e alguns desses estão sendo ao longo dos anos desenvolvidos para a prevenção do câncer. No entanto, o uso de algumas dessas substâncias pela medicina alternativa e complementar junto a tratamentos clínicos com substâncias antineoplásicas podem gerar interações medicamentosas (MEIJERMAN; BEIJNEN; SCHELLENS, 2006), por isso ao avaliar os efeitos terapêuticos de uma determinada substância, deve-se avaliar também seus efeitos colaterais (FUKUMASU et al., 2008).

Melo et al., (2011), menciona a necessidade de verificar através de estudos a segurança de plantas ou de produtos gerados a partir delas para analisar seus potenciais agentes antitumorais, principalmente aquelas que possuam apenas indicações etnofarmacológicas, fazendo uso de experimentos *in vitro*; espécies que já tiveram extratos ativos e isolados é preciso identificar as moléculas responsáveis pela atividade biológica; espécies que tiveram extratos ativos e moléculas conhecidas e significativa atividade *in vitro*, devem ser submetidas a estudos *in vivo*; e por fim, espécies que tenham cumprido todos os requisitos anteriores devem passar por extensa avaliação biológica *in vivo* e por estudos clínicos.

Em recente dissertação de mestrado da aluna Tatiana Ranieri desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada desta FMVZ, o óleo *in natura* extraído da árvore da espécie *Copaifera reticulata* Ducke mostrou seu potencial antitumoral *in vitro* em células cancerosas do pulmão humano. Uma vez que estudos prévios revelaram que o óleo *in natura* agiu como potente agente antitumoral induzindo apoptose em baixíssimas concentrações, destacamos o foco deste trabalho em determinar potenciais frações do óleo que permitam futuramente o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção a neoplasias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O CÂNCER E A SUA RELEVÂNCIA

O câncer é considerado uma das doenças que mais matam no mundo sendo um dos grandes obstáculos para a ciência médica pela grande dificuldade e complexidade para seu tratamento e cura (CHABNER; ROBERTS, 2005). Nos Estados Unidos, esta doença fica atrás apenas de doenças ligadas ao coração (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

A Organização Mundial da Saúde Junto a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) publicou em 2012, que a incidência de novos casos de neoplasia chega a quase 14,1 milhões em todo o mundo, além de registrar 8,2 milhões de morte pela doença (GLOBOCAN, 2012). Na figura 1, podemos observar para ambos os sexos quais tipos de tumores mais ocorrem em todo o mundo, sendo o câncer de pulmão o que mais incide e mata homens (figura 2) e o de mama em mulheres (figura 3).

Figura 1. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo em Homens e Mulheres.

Fonte: Adaptado de (GLOBOCAN, 2012).

Figura 2. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo para Homens.

Fonte: Adaptado de Globocan (2012).

Figura 3. Neoplasias que apresentam maior nível de incidência e mortalidade no mundo para Mulheres.

Fonte: Adaptado de Globocan (2012).

O câncer normalmente é causado por fatores extrínsecos ao organismo como o tabaco, organismos infecciosos, dietas pouco saudáveis e fatores endógenos como mutações genéticas herdadas, problemas endócrinos e pelas condições do sistema imune do indivíduo, podendo esses fatores agir em sequência ou mesmo em conjunto levando a caracterização da doença e até mesmo morte (SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2016).

Nos Estados Unidos da América, foram registrados quase 1,7 milhões de novos casos de neoplasias, cerca de 600 mil mortes causadas pela doença, onde 160 mil apenas por câncer de pulmão, em média 27% do total de mortes (figura 4) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015) e para o ano de 2016, estimaram 27% de mortes em homens e 26% de mortes em mulheres causadas por câncer de pulmão (SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2016) (figura 5).

Figura 4. Estimativa de novos casos e de mortes por câncer nos Estados Unidos em 2015.

Fonte: Adaptado de Siegel, Miller e Jemal, (2015).

Figura 5. Estimativa de novos casos e de mortes por câncer nos Estados Unidos para o ano de 2016.

Fonte: Adaptado de Siegel, Miller e Jemal (2016).

Em 2014, O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a incidência de doença para o país para os anos de 2014 em aproximadamente 580 mil novos casos incluindo todos os tipos de neoplasias. Em 2014, a estimativa dos dez tipos de câncer que apresentaram maior incidência no Brasil, mostrou que neoplasias do sistema respiratório foram de 5,4% em homens e 4,0% em mulheres (figura 6).

Figura 6. Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2014.

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: (INCA, 2014).

Cerca de 600 mil novos casos de câncer são esperados para o Brasil em 2016, com um aumento proporcional da doença em relação a 2014, estimam-se 17.330 de casos novos de câncer de traqueia, brônquios e pulmões entre homens e 10.890 entre mulheres (figura 7).

Figura 7. Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2016.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INCA, 2016).

Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,49 casos novos a cada 100 mil homens e 10,54 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

2.2. O CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão até o início do século XX era considerado uma doença rara (BRENNAN et al., 2011). Depois da 1ª Guerra Mundial ocorreu à fabricação em larga escala de cigarros que eram entregues aos soldados, aos poucos o consumo de tabaco foi elevando-se por toda a população mundial (INCA, 2014).

Durante as últimas décadas o câncer de pulmão em humanos se tornou uma das principais causas de morte por todo o mundo, ocorrendo com maior frequência do que outros cânceres como os de mama, os do pâncreas, de cólon e o de próstata (LANDIS et al., 1999) e é considerado uma das mais comuns malignidades humanas (TSUJIUCHI et al., 2005). Nas mulheres, o câncer mais frequente é o de mama, enquanto que nos homens, o mais é o de pulmão com aproximadamente 16,5% dos casos (BRAY et al., 2013) e tem sido a maior causa de morte no mundo quando o assunto é câncer (BRENNAN et al., 2011).

No Brasil, o câncer de pulmão é considerado a maior causa de mortalidade por neoplasias tanto na população masculina, quanto na população feminina, em ambos a neoplasia é oligossintomática e de hábito agressivo (LISTA et al., 2008), é uma doença devastadora com baixa taxa de sobrevida (SUTHERLAND; BERNIS, 2010). Quase sempre os pacientes são diagnosticados tardiamente, o que atrapalha as chances de tratamento; quando existe suspeita clínica, os achados podem ser obtidos através de técnicas de raio-x de tórax, tomografia computadorizada, broncoscopia e biópsia, mas infelizmente a grande maioria dos pacientes só tem a confirmação do diagnóstico quando as lesões se encontram localmente avançadas ou disseminadas (LISTA et al., 2008).

Pela íntima relação do epitélio pulmonar e do ambiente externo resultarem em uma situação de alto risco, ocorre que o epitélio se torna especialmente vulnerável a transformações malignas secundárias a exposição repetitiva e formação de lesões em função de poluentes carcinogênicos (KWAK; TSAI; DeMAYO, 2004).

As principais categorias histológicas de câncer nos pulmões são separadas em dois grupos principais os que tem origem em precursores de células epiteliais brônquicas, como o câncer de pulmão de células não pequenas (do inglês – *Non Small Cell Lung Cancer* ou NSCLC) que incluem os três principais tipos, o adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (BRENNAN et al., 2011; ACS, 2014) e o câncer de pulmão de células pequenas (do inglês – *Small Cell Lung Cancer* ou SCLC) que tem origem em precursores de células neuroendócrinas, sendo o menos comum entre as neoplasias pulmonares, porém o mais agressivo (ACS, 2014).

O câncer de pulmão, assim como a maioria das neoplasias o prognóstico do doente é ruim e limitado à uma média de cinco anos de sobrevida; no fumante o prognóstico é ainda pior em função da enorme carga de mutações nesses casos (KWON; BERNIS, 2013). É a única entre os principais tipos de neoplasias que tem uma etiologia ambiental óbvia e por isso grande potencial para a sua redução, mas como em todo mundo os esforços para o controle da doença têm se mantido estáveis, talvez continue mundialmente sendo o principal dos cânceres (RIDGE; McERLEAN; GINSBERG, 2013).

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (2004), o efeito carcinogênico da fumaça do tabaco no pulmão foi mostrado na década de 1950 e tem sido reconhecido pela Saúde Pública e autoridades regulatórias desde a década

de 1960, mostrando que os riscos para o consumo do tabaco e a formação de câncer de pulmão refletem sobre os diferentes aspectos do fumante, tais como o seu consumo médio, idade em que começou e duração do hábito de fumar, tipo de tabaco, padrão de inalação e o tempo desde que parou de fumar; em fumantes passivos o risco da doença chega a ser dez vezes maior que em fumantes ativos de fato.

Outros fatores aumentam o risco de câncer de pulmão da mesma maneira que o consumo de cigarros, tais como exposições ocupacionais ao asbesto, a radônio, a sílica livre, a pesticidas, a radiação ionizante, a metais como níquel, arsênico, cádmio, cromo, berílio, além de fatores como dieta de baixo consumo de frutas e verduras, poluição atmosférica, doença pulmonar obstrutiva crônica, fatores genéticos e também históricos de câncer familiar (ZAMBONI, 2002; DUARTE; PASCHOAL, 2006; FONSECA; RÊGO, 2013).

Apesar de os humanos serem apenas uma das espécies susceptíveis ao desenvolvimento espontâneo de neoplasias pulmonares, a doença é periodicamente observada por médicos veterinários em animais domésticos, normalmente cães e gatos de companhia de proprietários fumantes (LIU; JOHNSTON, 2002), no entanto pesquisas relacionadas à xenotransplantes são desenvolvidas através de implantação subcutânea, ortotópica, intratorácica e injeções vasculares de células humanas cancerosas em modelos experimentais translacionais como os procedidos em mamíferos e roedores (ZHANG; WU, 2009).

As neoplasias pulmonares primárias mais comuns nos animais domésticos são as de origem epitelial que podem ser benignas (papiloma bronquial, adenoma de glândulas bronquiais e adenoma bronquíolo-alveolar), malignas (carcinoma broncogênico, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anaplásico de pequenas e grandes células, carcinoma bronquíolo-alveolar, carcinoma alveolar, carcinoma de glândulas bronquiais e carcinóide) e de origem mesenquimal de origem benigna (hemangioma, mioblastoma) e malignos (hemangiossarcoma); as neoplasias secundárias metastáticas podem então ser qualquer outro tumor maligno de outra origem e/ou órgão (CARLTON; McGAVIN, 1998).

Estudos genéticos moleculares têm mostrado que loci genéticos múltiplos são capazes de contribuir para cânceres de pulmão, as anormalidades moleculares se

encontram nos oncogenes promotores de crescimento e em genes supressores tumorais (RISCH; PLASS, 2008).

Algumas alterações moleculares são conhecidas por estarem envolvidas na iniciação ou progressão tumoral, dessa maneira é preciso buscar terapias específicas e compreensão das moléculas e vias envolvidas na carcinogênese, tais como as ligadas a instabilidade genética, oncogenes, genes supressores de tumor, células tronco cancerosas, angiogênese e microambiente tumoral, metástases e transição epitélio mesenquimal, ativação da telomerase, mudanças epigenéticas como a metilação e modificação de histonas e também a regulação mediada por microRNA (JILL; JOHN, 2011).

A elucidação da genética individual nos últimos tempos relacionada à susceptibilidade para câncer de pulmão vem sendo considerada um passo à frente na compreensão da doença, uma vez que facilita o desenvolvimento de terapias alvo/específicas, fornecendo informações indicadoras do prognóstico em relação ao tratamento (RIDGE; McERLEAN; GINSBERG, 2013). A base molecular das neoplasias de pulmão é complexa e heterogênea, onde o conhecimento das alterações moleculares em diferentes níveis, sendo genéticos, epigenéticos e relacionados à expressão de proteínas, tem em seu significado funcional o papel de impactar o diagnóstico, prognóstico e tratamento desta doença (COOPER et al., 2013).

Embora o câncer de pulmão metastático esteja sempre associado a um prognóstico sombrio, o tratamento sistêmico pode melhorar a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência (NAIME et al., 2007). Um paciente em estágio inicial da doença pode ser tratado cirurgicamente com grandes possibilidades de aumento de sobrevida, o que não ocorre em casos de diagnóstico tardio, uma vez que cirurgias podem não ser a melhor opção; infelizmente os tratamentos com radioterapia e quimioterápicos mostram-se com baixa resposta quando o estadiamento do tumor é considerado avançado (BRENNAN et al., 2011). O diagnóstico pode ser feito através das técnicas de aspiração por agulha fina ou por biópsia com agulha fina, ambas podem ser muito importantes ao paciente que possua lesões difusas ou que tenha formações intratorácicas ou pulmonares e que venham a ser localizadas a partir de exames de imagem; por estas técnicas ocorrem 96% do sucesso do diagnóstico em humanos, principalmente nos casos de neoplasias malignas (COWELL et al., 2009).

Algumas combinações de medicamentos são utilizadas para o tratamento do câncer de pulmão, como terapias de cisplatina e vimblastina, cisplatina e etoposido, cisplatina com vindensina, vinblastina e mitomicina (BONOMI et al., 1989; WEICK; CROWLEY; NATALE, 1991). Alguns também são utilizados em terapias individuais contra neoplasias pulmonares, como a com paclitaxel, com docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecano, tapotecano (BMJ, 1995), cisplatina, com mitomicina, vimblastina e com etopósido (BUNN; KELLY, 1998).

2.3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS E ERVAS MEDICINAIS

A humanidade tem como uma de suas mais antigas práticas medicinais, o uso de plantas para a profilaxia, tratamento e cura de diversas patologias (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). Uma grande fonte para a obtenção de compostos ativos biologicamente são as plantas, de onde muitos se tornam referências para a sintetização de uma grande quantidade de fármacos (SIMÕES et al., 2010).

Durante milênios o uso de plantas para fins terapêuticos mostrou que algumas possuem substâncias perigosas, por isso merecem atenção e cuidado na sua utilização (OMS, 1998). Algumas dessas substâncias vindas de alguns vegetais têm atividade genotóxica e citotóxica, além de mostrarem relação com a incidência de tumores (AMES, 1983).

O uso de plantas medicinais desde o final do século passado vem aumentando com grande interesse por sua morfologia, composição química, por suas propriedades farmacológicas, pelas características das substâncias encontradas em algumas delas e pelo seu controle de qualidade principalmente quando se fala de plantas de origem brasileira (SIMÕES et al., 2010). No Brasil, muitas das conhecidas plantas com propriedades medicinais da flora do país são utilizadas com pouca comprovação e as vezes nenhuma informação concreta para sua utilização (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

A definição de planta medicinal segundo a Organização Mundial da Saúde (1998) diz que “todo e qualquer vegetal que contenha em uma ou mais de suas partes propriedades químicas que possam receber fins terapêuticos ou que possam ser precursores de alguma forma de medicamento semi-sintético”. São aquelas que possuem a capacidade para aliviar e mesmo curar algumas doenças, além de serem

de uso tradicional de algum determinado povo ou comunidade; para que sejam usadas, é necessário conhecê-las, tal como colhê-las e plantá-las; quando ocorre a industrialização de uma planta medicinal na intenção de se obter algum medicamento, surge o fitoterápico (ANVISA, 2015).

A biodiversidade oferece consigo componentes que podem gerar muitos produtos de interesse econômico são destaques os fitofármacos e os fitoterápicos, onde fitofármacos são consideradas as substâncias extraídas de vegetais e que possuam ação farmacológica com uso terapêutico; fitoterápicos são os medicamentos feitos apenas com plantas medicinais (SIMÕES et al., 2010).

Segundo a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) número 14 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010), medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos por uso exclusivo de vegetais onde a segurança para utilização e eficiência são avaliadas com base na etnofarmacologia ou mesmo por estudos científicos e evidências clínicas.

Os primeiros relatos quanto ao uso de vegetais no tratamento de enfermidades são datados desde 2600 anos a.C., onde as ervas medicinais eram utilizadas no tratamento de doenças que partiam de sintomas como os de um simples resfriado, a de infecções parasitárias e processos inflamatórios (GURIB-FAKIM, 2006).

Muitas plantas com propriedades fitoquímicas vêm sendo estudadas e utilizadas para prevenir e tratar o câncer em todo mundo, como a *Urtica membranacea* do Mediterrâneo (SOLOWEY et al., 2014), *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) da Ilha de Madagascar de onde é extraído a vinblastina e a vincristina, além de outras plantas medicinais africanas (KUETE; EFFERT, 2015). Substâncias como a apigenina da salsa, a curcumina e a crocetina do açafrão, a epigallocatequina galato do chá verde, a fisetina de morangos e maçãs, a genisteína da soja, o licopeno do tomate, o resveratrol e as cinidinas das uvas, o ácido rosmarínico do alecrim, dentre outros estão envolvidos na transdução de diferentes vias de sinalização (WANG et al., 2012), tais como via de proliferação celular, via de sobrevivência celular, via de ativação de caspase, via de supressão (p53, p21), via de receptores de morte celular, vias mitocondriais e via de proteína quinase (RAVINDRAN; PRASAD e AGGARWAL, 2009)

A quimioprevenção é definida como o uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos capazes de interromper, reverter, suprimir ou modular a

carcinogênese (SPORN et al., 1976). A maneira mais correta e racional para a quimioprevenção é buscar conhecimentos e testar novos compostos ou agentes químicos que atuem especificamente em alvos moleculares e celulares (SPORN; SUH, 2002).

2.4. ÁRVORE DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.)

As copaíbas são árvores conhecidas popularmente como copaibeiras, copaíba roxa, copaíba mari-mari, pau d'óleo e são chamadas assim provavelmente pela origem indígena do nome “kupa’iwa”, “kupa’u”, “cupa-yba”, que significa árvore de depósito (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002; AZEVEDO et al. 2004).

Na classificação botânica se encontra na família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera*, (LLOYD¹, 1898 apud PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Segundo o *Index Kewensis*² (1996) apud Pieri, Mussi e Moreira (2009) existem 72 espécies descritas e 16 encontradas apenas no Brasil.

Figura 8. A área escura representa os lugares onde o gênero *Copaifera* é encontrado.

Fonte: Adaptado de Sousa (2011).

¹ LLOYD, J.U. *Copaifera officinalis*. Chicago: **The Western Druggist**, 13p.1898.

² INDEX KEWENSIS. Supplement XX. Oxford: **Claredon Press**, 346p. 1996.

Algumas espécies dessas árvores são encontradas na América Latina e nas regiões brasileiras norte e centro-oeste, como a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Bth, *Copaifera coriacea* Mart., *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, dentre outras, onde no Brasil a mais comum é a espécie *Copaifera. langsdorfii* Desf.; na África Ocidental são descritas 19 espécies sendo as mais encontradas são: a *Copaifera convertifolia*, *Copaifera demeusii*, *Copaifera coleosperma*, *Copaifera conjugata*, *Copaifera hymenaefolia*, *Copaifera chodatiana* e *Copaifera fissicuspis* (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

As espécies de *Copaiferas* (Figura 9), podem atingir até 36m de altura. Sua copa é densa, sua casca é lisa com espessura que vai de 0,5cm até 2,0cm. Possui também um fuste reto de diâmetro que varia em uma árvore adulta de 40 a 50cm (AZEVEDO et al., 2004).

Figura 9. Exemplar de *Copaifera* sp. no estacionamento da Biblioteca Central do Campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Suas flores e folíolos são grandes e tem a cor branca (Figura 10), características que ajudam na diferenciação de outras espécies que possuem folíolos e flores menores que as copaíbas. Seus frutos (Figura 11) têm aproximadamente 1,5cm de espessura, 3,0cm de largura e 3,5 de comprimento, são vagens que podem ter de uma a duas sementes. Sua floração ocorre de janeiro a março e seus frutos podem ser coletados de março a agosto, chegando a produzir até 3kg de semente por árvore, dispondo de cerca de 1200 a 2000 sementes férteis cada (AZEVEDO et al., 2004).

Figura 10. Florescência da *Copaífera* sp.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 11. Folhas, frutos e semente de exemplar de *Copaífera* sp.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Existe grande interesse na madeira destas espécies por possuírem uma superfície lisa, de baixa permeabilidade, por serem lustráveis, duráveis e muito resistente a xilófagos e desta maneira, são excelentes para a fabricação de peças torneadas e para a indústria marceneira de modo geral (CARVALHO³, 1942 apud PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009), assim como existem interesses em seu óleo pelas indústrias de cosméticos e produtos farmacêuticos (SILVA, EDERLY et al., 2012).

No passado, o Governo Imperial em 1818 chegou a promulgar um ato regulamentando a extração dessas árvores, cujas só poderiam ser derrubadas por conta do governo e vendidas com margem de lucro de 20%. Isso tinha o objetivo de diminuir a destruição das florestas de copaíba que começavam a ser devastadas pela extração realizada sem critérios (CESAR⁴, 1956 apud VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). Apesar do empenho do governo da época, o problema perdura até os dias de hoje. A indústria madeireira na Amazônia é tão forte, que o óleo chega a ser considerado produto secundário da atividade. Grande parte dos óleos comercializados são obtidos através da extração total, sem chance de nova coleta através da derrubada das árvores (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

Segundo o Instituto de Desenvolvimento Florestal do Estado do Pará (IDEFLOR), no Edital 001/2011, no Anexo III da Lista de Espécies e Grupos de Valor do conjunto de glebas Mamuru – Arapiuns, os preços das madeiras da área extrativista são separados conforme sua categorização e grupo de comercialização, sendo as copaíbas encaixadas no grupo 4 (Quadro 1). Ao que consta em uma Autorização para Exploração Florestal concedida pela Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Sustentabilidade do estado do Pará (SEMAS/PA), para a exploração numa área sob domínio e propriedade do governo do estado do Pará no Município de Aveiro, expedida em 20 de maio de 2015, empresas podem realizar o corte de árvores; os números chegam a quase 10000 indivíduos, desses aproximadamente 75 exemplares pertencem ao gênero *Copaifera* sp. (Instituto de Desenvolvimento Florestal do Estado do Pará - IDEFLOR, 2015).

Santos e Guerra (2010), num estudo no ano de 2006 acompanhou 24 famílias extrativistas de óleo de copaíba e andiroba organizadas em uma associação

³ CARVALHO, J.B.M. O Norte e a indústria de óleos vegetais sob o aspecto técnico-econômico. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, 135p, 1942.

⁴ Cesar, G.; Curiosidades da Nossa Flora; **Imprensa Oficial**, p. 374. Recife, 1956.

intercomunitária para comercialização de seus produtos na Floresta Nacional do Tapajós no estado do Pará e mostrou que quando o óleo de copaíba é comercializado diretamente pelos extrativistas, o preço por litro sai por R\$ 15,00 e quando comercializados pela associação para atacadistas chega a R\$ 30,00, justificados por situações como a produção sazonal, que diminui a oferta com regularidade do produto e o pouco beneficiamento do óleo pelos extrativistas, o que gera uma produção sem instabilidade, conflitando o período das extrações com o uso madeireiro.

Quadro 1. Categorização e classificação comercial da madeira obtida de árvores de copaíba.

Categoria		Grupo de Comercialização das Madeiras	Preço R\$/m³
1	Madeiras Especiais	Propensas a extinção de alto valor regional, nacional e internacional	89,50
2	Madeiras Nobres	Comercializadas no mercado regional, nacional e internacional	59,00
3	Madeiras Vermelhas	Comercializadas no mercado regional, nacional e internacional	32,50
4	Madeiras Mistas	Comercializadas de serra e lâmina duras	16,50
5	Madeiras Brancas	Comercializadas de serra e lâmina moles	12,00

Fonte: Adaptado Ideflor (2011).

Os estoques naturais de copaíba podem ser esgotados através da ação extrativista de madeira, como tem ocorrido na Floresta Nacional do Tapajós, uma vez que as condições econômicas da sociedade da região estão voltadas para o lucro imediato, enquanto que para a obtenção do óleo ocorrem grandes perdas e apresentação de um produto de baixa qualidade, sendo necessário a implementação de programas de infraestrutura coletiva que visem competir e se sobrepôr ao mercado madeireiro (SILVA et al., 2010), bem como a execução de projetos modelo para reservas extrativistas, onde pela incorporação de tecnologias simples de manejo da espécie e do suporte técnico para o acompanhamento de processos de beneficiamento, comercialização e registro do plano de manejo comunitário podem melhorar a renda da comunidade e valorizar a espécie de interesse (LEITE, 2004), assim como o que vem ocorrendo através do Projeto Kamukaia que tem auxiliado no

manejo sustentável de produtos florestais não-madeireiros da Amazônia, incluindo o manejo de árvores de copaíba (EMBRAPA ACRE, 2008).

2.5. ÓLEO DE COPAÍBA

O óleo de copaíba é considerado um óleo-resina natural (VEIGA JÚNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997), uma vez que provém de canais denominados esquizolizígeos formados pela dilatação dos espaços intracelulares da planta; são canais secretores (Figura 12) que ocupam todas as partes da árvore (CARVALHO⁵, 2004 apud GONÇALVES, 2014).

Figura 12. Madeira da *Copaifera* sp.; seus canais secretores. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental, Cidade de Belém-PA).

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

É obtido através de furos feitos no tronco com trado tradicional na altura aproximada de 1m e 1,5m, onde tubos de pvc (policloreto de vinil) são utilizados com o propósito de vedar os orifícios após a coleta e facilitar novas extrações (Figura 13)

⁵ CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, p.480, 2004.

(OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). O ciclo de colheita considerado ideal para as espécies é de 3 anos (KLAUBERG et al., 2014).

Figura 13. Perfuração do tronco com o trado tradicional (A); Localização dos furos e vedação com pvc (B) e Coleta do óleo (C, D). (Extração do óleo *C. reticulata* Ducke, sob registro no Herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental, Exsicata 183939).

Fonte: Adaptado de Oliveira, Lameira, Zoghbi (2006).

O óleo do gênero *Copaifera* sp. (Figura 14) apresenta características físico-químicas específicas, tais como odor característico, limpidez, transparência, pH entre 5,0 a 5,4, densidade a 25°C de 0,900 a 0,930g/m³, no máximo 3% de ácidos graxos livres e coloração, que sai do amarelo para vermelho, até o marrom; aqueles de coloração mais clara apresentam menor viscosidade em relação aos mais escuros (SILVA⁶, 1911 e MATOS FILHO⁷, 1993 apud LIMA; LIMA, 2012; DISTRION, 2016).

O óleo (*C. officinalis*) apresenta ponto de ebulição em torno de 250°C, ponto de fusão menor que 10°C e ponto de inflamação aproximadamente 84°C (NATURAL SOURCING DATA SHEET, 2014).

⁶ SILVA, J. R. M.; **Contribuição para o estudo da flora brasileira**; Rio de Janeiro, p. 81, 1911.

⁷ MATOS FILHO et al.; **Árvores do Jardim Botânico**; Ed. Lidador: Rio de Janeiro, p. 67, 1993.

Critérios relevantes e importantes, tal como a técnica de extração, material botânico e as diferenças genéticas da espécie podem modificar a atividade medicinal do óleo (MENEZES et al., 2009), que tem sido utilizado como anti-inflamatório prescrito por médicos tradicionais da Amazônia e já esteve no passado nas farmacopeias da Europa e América do Norte (VEIGA JÚNIOR et al., 2007).

Figura 14. Óleos da *Copaifera* sp.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Acredita-se que a primeira citação sobre ele, ocorreu no ano de 1534, quando em uma carta publicada em Estrasburgo na França, uma carta destinada ao Papa Leão X, escrita por Pethus Martins, mencionou-se o nome “copei” como a droga dos índios (Dwyer⁸, 1951 apud VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

Em 1560, numa carta escrita por José de Anchieta em que ele atende a um pedido do Prior da Companhia de Jesus para que “se escrevessem as coisas que, entre nós, fossem ou dignas de admiração ou desconhecidas deste mundo”, ele diz:

“De entre as árvores, uma parece digna de menção (posto que haja outras que destillam um liquido, semelhante a resina, e que serve para remédio) a qual distilla um succo delicadíssimo, que alguns querem que seja bálsamo; o qual, a princípio pelos furinhos, feitos pelo caruncho, ou também pelas incisões aberta

⁸ Dwyer, J. D.; *Brittonia*. 7, 143, 1951.

com facas, ou machadinhos, corre como azeite, depois, coagulando-se, parece apresentar a apparencia de bálsamo: o cheiro que desprende não é muito forte, mas agradabilíssimo; e é excellente para curar feridas, porque nem mesmo restam vestígios de cicatrizes, como dizem que se provou pela experiência”. (RODRIGUES⁹, 1934, p. 361 apud ALFONSO-GOLDFARB; FERRAZ; BELTRAN, 2010).

Na descrição feita por Pero Magalhães Gandavo no seu livro “História da Província de Santa Cruz” em 1576, ele escreve:

“Um certo gênero de árvores há também pelo mato a dentro da Capitania de Pernambuco a que chamam Copaíbas, de que se tira o bálsamo mui salutífero e proveitoso o extremo, para enfermidades de muitas maneiras, principalmente as que procedem a frialdade: causa grandes efeitos, e tira todas as dores por graves que sejam em muito breve espaço. Para feridas ou quaisquer outras chagas, tem a mesma virtude, as quais tanto que com ele acodem, saram mui depressa, e tira os sinais de maneira, que de maravilha se enxergam onde estiveram e nisto se faz vantagem a todas as outras medicinas”. (GANDAVO¹⁰, 1576, p.18 apud VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

Em 1587, na obra de Gabriel Soares de Souza chamada Tratado Descritivo do Brasil, ele registrou que óleo era usado por europeus e que os produtos naturais do país eram “árvores e ervas da virtude” (CARRARA; MEIRELLES¹¹, 1996 apud VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

⁹ RODRIGUES, L.; **Anchieta e a medicina**; Edições Apollo: Belo Horizonte, p.361, 1934.

¹⁰ GANDAVO, P. M.; História da Província de Santa Cruz a que vulgarmente Chamamos Brasil; **Officina Antônio Gonsalvez**. Lisboa, p. 18, 1576.

¹¹ CARRARA JÚNIOR & E.; MEIRELLES, H.; A Indústria Química e o Desenvolvimento do Brasil - 1500-1889; **Metalivros**. São Paulo, 1996, p. 115.

2.6. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.)

Estudos relacionados a composição química dos óleos tem sido realizado ao longo dos anos mostrando que o óleo de copaíba possui uma grande variedade de moléculas, que podem ser separadas em dois grupos os sesquiterpenos (tabela 1) e os diterpenos (tabela 2), que são encontrados na fração volátil e na fração resinosa respectivamente. Investigações das composições químicas e da atividade antiinflamatória do óleo de copaíba obtidos de espécies diferentes da árvore, mostram que mesmo sendo espécies filogenicamente próximas possuem composição variada (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Tabela 1. Componentes Sesquiterpênicos da *Copaifera* sp.

Sesquiterpenos		
α -elemeno	Multigenol	acetoxi-cariofileno
α -cubebeno	Aromadendreno	Ledol
α -copaeno	α -humuleno	β -vetiveno
β -cubebeno	α -curcumeno	α -caryofilenol
α -cedreno	γ -amorpheno	δ -cadineno
Calareno	germacreno D	α -selineno
Longifoleno	α -aromadendreno	α -cadinol
germacreno B	α -bisaboleno óxido	α -cadineno
β -bisaboleno	β -bisabolol	Cadaleno
Óxido cariofileno	γ -cadineno	β -sesquiphelandreno
Guaiol	β -cariofileno	
Cedrol	α -bergamoteno	

Fonte: Adaptado de Veiga Júnior et al. (2007).

Tabela 2. Componentes Diterpênicos da *Copaifera* sp.

Diterpenos	
16-caurano	methl hardwickiato
metil eperuato	dimetil pinifolato
metil cativato	metil clorechinato
metil kaurenoato	dimetill clerod-3-en-15,18-dioato
metil copalato	dimetil agathato
metil kolavenato	metil 3-hidroxi-copalato metil 3-acetoxi-copalato

Fonte: Adaptado de Veiga Júnior et al. (2007).

As variações observadas nos óleos-resina propiciam diversificadas utilizações industriais cosméticas e farmacêuticas: um óleo mais fino e menos ácido por exemplo, possuem maiores quantidades de óleos essenciais podendo ser destinado a produção de cosméticos e medicamentos (SILVA, EDERLY et al., 2012). O óleo tem sido estudado e fracionado por várias técnicas, que incluem técnicas mais simples como a hidrodestilação (PEÇANHA et al., 2014) e também de técnicas mais apuradas como cromatografia gasosa de alta resolução (VEIGA JÚNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997), separação através de cromatografia flash (PINTO et al., 2000), cromatografia de troca-iônica (BARRETO JÚNIOR et al., 2005), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (HERRERO-JÁUREGUI et al., 2011), fracionamento por CO₂ supercrítico (BARRALES et al., 2016), cromatografia em fase gasosa acoplada a detectores de ionização de chama, cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (BARBOSA, 2012), dentre outras.

Em estudo que avaliou o uso de métodos analíticos convencionais para atestar a autenticidade do óleo de copaíba, tendo como critério básico o emprego do teste de solubilidade da amostra em álcool absoluto, onde a insolubilidade parcial revela a presença de óleo graxo na amostra. Também são utilizados métodos que estimam o índice de acidez e o índice de éster. No teste da acidez, o índice é calculado através de equação matemática que determinam que quando os valores obtidos são mais baixos que 80mgKOH/g existe contaminante na amostra. No teste de éster, o índice também é dado a partir de uma equação, na qual verifica-se que quando o valor é maior que 23mgKOH/g o contaminante é um ácido graxo (VASCONCELOS; GODINHO, 2002).

Algumas informações comerciais e acadêmicas sobre os ácidos graxos do óleo de copaíba, mostram uma variedade deles em sua composição, como ácido mirístico, palmítico, palmitoléico, estereárico, oleico, linoleico, linoleádico, linolênico, aráquico, gadoleico, beênico, tetradecanóico e cumarinas (MAIA et al., 1978; ABREU, 2014; DISTRION, 2016). As sementes da espécie *C. officinalis* L. foram avaliadas quanto a sua composição graxa após a esterificação com diazometano, sendo possível identificar vários ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos: hexadecanóico (palmítico), 9-octadecanóico (oleico), octadecanóico (esteárico), decanóico, eicosanóico (aráquico), docosanóico (behênico) e tetracosanóico (lignocérico) (VEIGA JÚNIOR et al. 2007).

2.7. INDICAÇÕES MEDICINAIS DO ÓLEO

As indicações etnofarmacológicas do óleo são as mais variadas, tendo ação nas vias urinárias e respiratórias, nas infecções da derme e das mucosas através de administração oral ou tópica; as indicações incluem: antisséptico, para tratar gonorreia, bronquite, dores de uma maneira geral, como cicatrizante em feridas, como antiblenorrágico, para leucorreia, psoríase, asma, úlceras cutâneas, inflamações articulares, cistos ovarianos, mioma uterino, corrimento vaginal, infecções de garganta, infecções geniturinárias, inflamações diversas, doenças do trato digestivo, contra leishmaniose e neoplasias (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2007). Muitas das atribuições medicinais populares e etnofarmacológicas do óleo de copaíba tem sido investigadas entre as espécies do gênero e suas atividades biológicas (quadro 2).

Quadro 2. Diferentes atividades biológicas testadas do óleo das espécies do gênero *Copaifera* sp.

Espécie	Atividade Biológica Avaliada
<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke	Antimicrobica, Antiinflamatória, Antileishmânica
<i>C. duckei</i> Dwyer	Antiproliferativa, Antimutagênica, Antiinflamatória, Analgésica
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	Antimicrobica, Gastroprotetora, Cicatrização de feridas, Antioxidante, Inseticida, Antiinflamatória, Antileishmânica, Antimutagênica
<i>C. lucens</i> Dwyer	Antimicrobica, Antileishmânica
<i>C. martii</i> Hayne	Antimicrobica, Antileishmânica
<i>C. multijuga</i> Hayne	Antiinflamatória, Antimicrobica, Antitumoral, Antinociceptivo, Antileishmânica
<i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.	Antimicrobica, Antisquêmica, Antiinflamatória, Antileishmânica, Antitumoral
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer	Antimicrobica, Antileishmânica
<i>C. reticulata</i> Ducke	Antiinflamatória, Antimicrobica, Inseticida, Antinociceptiva, Antileishmânica, Cicatrização, Ansiolítica

Fonte: Adaptado de Leandro et al. (2012).

Além de algumas indicações etnofarmacológicas, outros efeitos biológicos do óleo de copaíba foram relatados, como ação cicatrizante na administração tópica de pomada de copaíba (*C. langsdorffii*), em que mostrou que o tratamento favoreceu a neoangiogênese e a acelerou a viabilidade do tecido (ESTEVÃO et al., 2009;

ESTEVÃO et al. 2013). Na cicatrização de feridas (MONTES et al., 2009); na cicatrização alveolar após exodontia em ratos wistar sob administração sistêmica por gavagem (SILVA et al., 2013) discordando de Futida (2010) que afirmou que o óleo não exerceu nem interferiu com o processo de reparação óssea alveolar em condições experimentais semelhantes.

Também age como anti-inflamatório (VEIGA JÚNIOR et al., 2001) e inibiu edema induzido por carragenina em ratos, em que influenciou a diminuição da permeabilidade vascular e diminuição da liberação de histamina (BASILE et al., 1988), podendo interferir na atividade da ciclooxigenase (VIRIATO et al., 2009).

Como antinociceptivo: em pesquisa que avaliou a segurança do uso por via oral do óleo da *C. multijuga* Hayne em doses repetidas em modelos de peritonite induzida e contorções abdominais em camundongos swiss, foram observados baixa toxicidade, nenhuma interferência na morfologia dos tecidos, reduziu o ganho de massa das gestantes, não interferiu na capacidade reprodutiva dos machos nem com o desenvolvimento da prole, mas mostrou ser nefrotóxica em ratos e coelhos, onde aumentou o nível de creatinina sérica dos animais (GONÇALVES, 2014). Apresentou resultados com efeito antinociceptivo para óleos de diferentes espécies e suas frações (GOMES et al., 2007; GOMES et al., 2010).

O desenvolvimento de microcápsulas de goma arábica contendo a fração volátil de copaíba, mostrou que seu efeito é o mesmo de sua fração volátil livre na inibição da resposta inflamatória em ensaio de pleurisia e edema de pata induzida em camundongos Swiss, possibilitando seu uso como forma farmacêutica ou intermediária na preparação de outras (RAMOS, 2006).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos de diâmetro menor que 1µm, compostas por núcleo lipofílico envolvido em parede polimérica e estabilizados por tensoativos (MELO JÚNIOR et al., 2012). Estudos relacionados com estabilidade de suspensões de nanopartículas por método de deposição interfacial de polímero pré-formado (PACHECO, 2014) e nanopartículas magnéticas de magnetita e copaíba mostraram-se estáveis (OLIVEIRA, 2015).

O óleo também foi capaz de atenuar o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida em camundongos mesmo gerando leve processo inflamatório e espessamento dos septos alveolares (FREITAS, 2006). Quando injetado no espaço pleural de ratos aumenta a espessura da pleura com intensa irritação da região pleuro-pulmonar (WESTPHAL et al. 2007).

O óleo da *Copaifera langsdorffii* revelou ter efeito antipsoriático através da sua forte capacidade antioxidante e antiinflamatória (GELMINI et al., 2013). Estudos tem avaliado estes efeitos do óleo e buscado alternativas nos nanocosméticos para o tratamento da psoríase (SOARES, 2013), mostrando que as nanoemulsões podem ser uma alternativa de fixação dos compostos voláteis (DIAS et al., 2014).

Numa avaliação do potencial gastroprotetor do extrato e dos componentes isolados das folhas da *C. langsdorffii*, foi possível observar a diminuição de secreção gástrica e aumento da produção de muco (LE MOS et al., 2015), como a que se pode observar com o uso do óleo da *Copaifera malmei* Harms (ADZU et al., 2015) e com o uso do óleo da *multijuga* (PAIVA et al., 1998). Já com o óleo extraído no município de Tucuruí, no sudeste do estado do Pará, provavelmente da espécie *reticulata*, o uso oral de até 0,63mL/kg promoveu gastroplegia, evidenciada pelo aumento da área gástrica, pela coloração pálida e diminuição de pregas das mucosas, mas tanto com esta dose como com 0,06mL/kg ocorreu a diminuição da congestão vascular na parede gástrica de ratos wistar observada após eutanásia e necropsia dos mesmos (BRITO et al., 2001).

O efeito do óleo (*C. officinalis*) foi avaliado frente a possíveis processos maléficos aos hepatócitos induzidos por acetaminofeno em ratos; os resultados mostram que quando administrado profilaticamente, podem reduzir os danos ao fígado causados (TEIXEIRA et al., 2013).

Em modelo murino de encefalomielite autoimune usado para estudar a esclerose múltipla, óleo foi avaliado sobre a produção de NO, H₂O₂, TNF- α , IFN - γ e IL-17 a partir do cultivo de esplenócitos de camundongos e teve seu efeito imunomodulador demonstrado pela a inibição da produção das mesmas, mostrando ser capaz de modular a resposta imune das células T helper 1 e T helper 17, que quando estimuladas induzem a produção de citocinas inflamatórias (DIAS et al., 2014). O óleo de três diferentes espécies também foi reconhecido por exercer atividade sem afetar a viabilidade celular de monócitos humanos em relação a pró e anti-produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e Interleucina-10); ocorrido talvez pelo envolvimento dos diterpenos e sesquiterpenos em seus mecanismos de ação (SANTIAGO et al., 2015).

Afirma-se que o óleo de copaíba possui atividade microbiana a diversos microrganismos patógenos (MENDONÇA; ONOFRE, 2009). Como bactericida e/ou

bacteriostático, o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) apresentou efeitos contra bactérias gram-positivas multirresistentes (*Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus capitis*) (ABRÃO et al. 2015). O óleo *C. duckei* Dwyer mostrou atividade contra outras 11 espécies de bactérias, podendo ser utilizado como terapia alternativa no tratamento de infecções bacterianas (SANTOS, Elizabeth et al., 2013). Resultados indicam que o óleo tem ação sobre a bactéria *Propionibacterium acnes*, sugerindo também a eficiência dele em tratamentos para a doença acne vulgar (SILVA, Ary et al., 2012).

O óleo mostrou agir contra bactérias cariogênicas (PIERI et al., 2012). Mussi (2012), demonstrou que o óleo inibiu a coagregação e autoagregação das bactérias bucais *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, sendo bactericida para *P. gingivalis*. O óleo da espécie *Copaifera multijuga* Hayne foi eficiente contra culturas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei* (BARI et al., 2016), mostrando que o óleo pode ser útil como alternativa para o tratamento de infecções que causam cárie e periodontite (BARDAJÍ et al. 2016).

Santos et al. (2012) mostrou em seu estudo que o óleo de copaíba foi melhor que o óleo de andiroba na determinação da concentração mínima inibitória sob o cultivo de *Paenibacillus larvae* (bactéria que causa uma doença chamada Loque Americana nas larvas das abelhas gerando inúmeros danos e prejuízos a produção de mel).

Santos (2008), estudou a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba do Brasil de diferentes espécies e quanto a ação antifúngica, os óleos das espécies *Copaifera paupera* e *Copaifera lucens* exibiram moderada atividade contra *T. rubrum* e *Microsporum canis* e as *Copaiferas cearensis*, *langsdorffii* e *multijuga* Hayne também mostraram ação contra o fungo *Tricophyton rubrum*, mas segundo o autor, os óleos foram ineficientes e inativos contra leveduras. Em Deus, Alves e Arruda (2011), após 8 dias de tratamento com óleo de copaíba da espécie *C. multijuga* houve inibição do crescimento das colônias de *Candida albicans* cultivadas em ágar Sabouraud dextrose. Valverde (2007) não verificou nenhuma atividade do extrato etanólico frente ao cultivo de cepas de *Candida* sp.

Pesquisas recentes mostram a ação de um diterpeno o ácido 3 α -hydroxy-kaurenoic do óleo resina de copaíba com alta ação fungitóxica contra *Botrytis cinérea*, um fungo que ataca vários sistemas e partes da planta como flores, frutos,

etc. O autor, ainda sugere uma provável ação pela inibição da germinação e crescimento micelial neste fungo (COTORAS, FOLCH; MENDONZA¹², 2004 apud LEANDRO et al., 2012). Em 2013, o óleo (*C. langsdorffii*) *in vitro* mostrou atividade contra fungos dermatófitos, mostrando que mais estudos podem ser úteis para pesquisa sobre seu uso quanto fungicida ou fungistático tanto em animais quanto em seres humanos (ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013). Alguns autores, que mencionam que o óleo tem a função nos vegetais de proteger contra infecções por microrganismos especialmente fungos (DWYER¹³, 1954 apud VEIGA JÚNIOR et al., 2001).

Em aves, o óleo foi usado na ração afim de que se avaliasse sua interferência ou não no desempenho e rendimento de abate de frangos, constatando que até o nível de 0,15MI/Kg⁻¹ e foi considerado seguro por não alterar o desempenho dos animais (AGUILAR et al., 2013). Alguns estudos têm testado o óleo de copaíba sobre degradabilidade e digestibilidade animal em algumas espécies produtoras de carne e leite, como em ovinos (ABREU, 2014) e bovinos (ARAÚJO, 2010; BENTO, 2016). Com a inclusão de até 1,5g/kgMS⁻¹ de óleo de copaíba na dieta de cordeiros melhorou a digestibilidade *in vivo* da matéria seca e a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro, não afetando o consumo e a digestão dos nutrientes; em bovinos Lima (2015) e Bento (2016) notaram que o fornecimento de copaíba como aditivo nutricional não influenciou o pH ruminal, nem sobre a digestibilidade dos nutrientes, nem sobre a degradabilidade ruminal e variáveis ruminais sob condição de consumo voluntário.

Alguns estudos vêm usando de diversas metodologias *in vivo* e *in vitro* para avaliar os efeitos do óleo de copaíba frente o DNA e ao cultivo de diferentes linhagens celulares normais e cancerosas. O óleo da *C. duckei* Dwyer não provocou diminuição significativa no índice mitótico, não produziu efeitos mutagênicos quando testado em células da medula óssea e nem em reticulócitos de ratos Wistar, porém quando usado em altas doses foi forte agente citotóxico (MAISTRO et al., 2005). Em cultivo de células V79 (células fibroblásticas provenientes de pulmão de hamster chinês), um componente diterpênico da *C. langsdorffii* induziu elevados danos ao

¹² COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β - hydroxy-kaurenoic acid. **J. Agric. Food Chem.** 52, 2821-2826, 2004.

¹³ DWYER D. Further studies on the New World species of *Copaifera*. **Bull Torr Bot Club** 81:179-187. 1954.

DNA (CAVALCANTI et al., 2006). O óleo *Copaifera* sp.; suas frações não apresentaram efeitos genotóxicos, nem teratogenicidade nem mutagenicidade analisados por teste de micronúcleo dos eritrócitos de camundongos swiss submetidos ao tratamento por gavagem (500, 1000 e 2000mg/kg) (ALMEIDA et al., 2012). Mas já o óleo da *C. langsdorffii* reduziu a extensão do dano ao DNA induzido por dimetilhidrazina no cólon de ratas wistar, sugerindo efeito protetivo a carcinogênese do cólon (SENEDESE et al., 2013).

Amostras de polifenóis extraídos do fruto da espécie *C. langsdorffii* possuem ação antioxidante e antimutagênica como mostrada em estudo de clastogenicidade induzida por ciclosfosfamida em camundongos swiss, em que apenas uma dose mediana foi suficiente para reduzir os efeitos deletérios *in vivo* (BATISTA et al., 2016).

Cunha (2006) e Costa-Lotufo et al., (2002) usaram o ácido caurenóico obtido do óleo da espécie *C. langsdorffii* em cultivo de células tumorais mamárias, de câncer de cólon e de células leucêmicas e verificou que o componente inibiu a proliferação dessas linhagens. Quanto ao óleo desta mesma espécie em tumor de Walker 256 inoculado na vagina e no cólon do útero de ratas wistar, ao contrário do que se esperava estimulou o crescimento tumoral e não alterou a resposta imunológica (BRITO et al., 2010; BOTELHO et al., 2013).

O óleo da espécie *C. langsdorffii* também foi considerado antitumoral para células da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma mamário de humanos (ABRÃO et al. 2015).

Estudos tem mostrado que derivados diterpênicos possuem ação antitumoral por induzir as células à apoptose (OHSAKI et al., 1994; HUESO-FALCÓN et al., 2010; LIZARTE NETO et al., 2013). A ação antitumoral também foi observada com o uso do óleo puro e suas frações (*C. multijuga* Hayne) em linhagem de melanoma em modelo murino *in vivo* e *in vitro* (LIMA et al., 2003) e em tumor de Ehrlich (GOMES et al., 2008).

2.8. *Copaifera reticulata* Ducke

A *Copaifera reticulata* Ducke segundo os Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (1915) é uma árvore de 5–8m altura, com ramos cilíndricos e tomentosos.

Suas estípulas não observadas, caducas; pecíolo 0,9–1,2cm comprimento; seu raque possui de 4–6cm comprimento e é canaliculada; há ausência de nectários. Suas folhas são alternadas, pecioladas e penuladas, imparipinadas; os folíolos 2,5–3(–4,5) × 1–1,5(–1,7) cm, alternos, ovado-lanceolados ou elípticos, com a base aguda ou obtusa, de ápice retuso, obtuso ou agudo e face adaxial glabra e face abaxial tomentosa na nervura principal com venação reticulada. Suas Inflorescências são em formato de panícula de espigas, axilares; com pedúnculo de 1,5–2cm comprimento, tomentoso; raque de 4-5cm comprimento e tomentosa. De flores tetrâmeras, apétalas, sésseis; cálice com 9mm de comprimento, dialissépalo, sépalas ovadas e presença de glabras externamente; corola ausente; estames em 8, homodínamos, dialistêmones com filetes de 5mm comprimento, glabros, anteras com 1mm comprimento, sem estaminódios; ovário sésil cerca de 2mm comprimento, barbado; estilete de 3mm comprimento, curvado, glabro; estigma terminal, glabro. Legumes, 2–3 × 1,5–1,8cm, túrgidos e glabros; com uma semente de cerca de 1,8 × 1,2cm, arredondada, enegrecida de arilo amarelado ou alaranjado (MARTINS DA SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; LIMA et al., 2010).

Investigações das composições químicas e atividade dos óleos das espécies *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke e espécie *Copaifera reticulata* Ducke no experimento de Veiga Júnior et al., (2007), provaram que mesmo semelhantes, os óleos possuem composição variada e que o composto principal entre os sesquiterpenos que compõe as copaíbas estudadas foi o β -cariofileno, com maior concentração na *C. reticulata* Ducke, seguindo o α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno e δ -cadineno, com diferentes quantidades em cada óleo-resina; entre os diterpenos, o ácido copálico foi encontrado em todos os óleo-resinas; já os ácidos caurenóico e kolavenic predominaram na espécie *Copaifera reticulata* Ducke.

Os óleos resina de 12 árvores de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) proveniente dos Estados do Pará e Amapá foram examinados através de estudos cromatográficos e apresentaram ser diferentes em seus compostos e na quantidade de cada um quando em comuns nas amostras (ZOGHBI et al. 2009).

Variáveis do meio ambiente, como tipo de solo, estação de coleta do óleo; variações da morfometria da árvore, como altura, altura do primeiro ramo, do diâmetro na altura do peito, da área, forma e posição da coroa, ramos quebrados e regiões ocas no tronco; além de interações com outras espécies e estrutura da

floresta onde os exemplares se encontram devem ser consideradas como fatores que podem influenciar a composição do óleo (*C. reticulata* Ducke) (HERRERO-JÁUREGUI et al., 2011).

Amostras de óleo-resina foram coletadas no Campo Experimental do Mojú da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental e nos meses de setembro e outubro ocorreram as maiores produções de óleo para a espécie *C. reticulata*, coincidindo com o período de menor precipitação pluviométrica. A menor produção de óleo ocorreu no período de janeiro a maio de 2004, coincidindo com o período mais chuvoso. A *C. reticulata*, produziu um óleo-resina de aspecto líquido e de coloração amarelo claro (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

A maior produção de óleo de copaíba da espécie *Copaifera reticulata* Ducke (Exsicata 183939, registrada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental) na Floresta Nacional do Tapajós segundo Oliveira, E. et al., (2011a) ocorreu no mês de outubro, coincidindo com o período menos chuvoso e a menor produção no mês de fevereiro, que correspondeu ao período mais intenso de chuvas na região. Estudos alertam para o risco de endogamia das *Copaiferas* desta região (SILVA, 2011). Óleos desta espécie de outras árvores da mesma região apresentam baixa acidez e alto índice de saponificação (SILVA, EDERLY et al., 2012).

Em outro estudo que caracterizou a composição de compostos voláteis desta espécie, foi possível detectar através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas a presença de trinta e seis sesquiterpenos, identificados em sua maioria b-bisaboleno, trans a-bergamoteno, b-cariofileno (HERRERO-JÁUREGUI et al., 2011). Ziech et al., (2013), quantificou a fração volátil (*C. reticulata* Ducke) e de acordo com a descrição em Veiga Júnior et al., (2007), o componente em maior quantidade foi o β -cariofileno.

Em alguns óleos, foi encontrado maiores quantidades de ácido caurenóico, principalmente no óleo da *Copaifera reticulata* Ducke, ao qual foi atribuída a atividade antimicrobiana (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997). Seus extrato etanólico da casca, folhas e galhos foi eficiente contra o crescimento *in vitro* do microrganismo causador de uma das principais doenças na cultura do maracujá, o *Xanthomonas axonopodis* pv. *paniflorae* (ISHIDA et al., 2008). Quando testado sob o crescimento de microrganismos bacterianos bucais que causam carie e periodontite, o óleo desta espécie se mostra eficiente *in vitro* no crescimento de *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *L. casei*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum* (BADARJÍ et al.,

2016), *S. aureus* (BONAN et al., 2015) e também ação em microrganismo isolado de otite de cães (*Staphylococcus*) (ZIECH et al., 2013).

O óleo (*C. reticulata* Ducke) também demonstra potencial antifúngico pela inibição proporcional do crescimento de esporos do *Fusarium* (causador de grande prejuízo em culturas de arroz, milho, sorgo, trigo e cevada) (DINIZ et al., 2002), no crescimento micelial de fitopatógenos em função da concentração do óleo-resina, (LAMEIRA, 2007; OLIVEIRA, Eliane et al. 2011b) e pela inibição do crescimento de colônias do fungo *Rhizoctonia solani* (PIRES et al. 2015) e pela inibição de culturas leveduriformes de *Candida albicans* (DOMINGUES; VIEIRA FILHO; MÁXIMO, 2013; DOMINGUES; MÁXIMO, 2016).

O óleo (*Copaifera reticulata* Ducke), tem se mostrado eficiente contra carrapatos da espécie *Rhipicephalus (boophilus) micropolus* (FERNANDES; FREITAS, 2007) e também contra protozoários como em *Trypanossoma cruzi*, *Trypanossoma evansi* (IZUMI, 2010; DORNELES; SILVA; OLIVEIRA, 2013). Izumi (2010) relata que foi possível verificar alterações estruturais no *T. cruzi*, determinada pela desorganização nuclear, “swelling mitocondrial” (inchaço), formação de vacúolos membranosos, destacamento do flagelo e diminuição do volume celular. O óleo é considerado uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas contra leishmaniose, uma vez que nas formas promastigota e amastigota o mesmo causou mudanças morfológicas e estruturais, incluindo extenso dano a mitocôndria e desnaturação da membrana plasmática (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2011).

O óleo da espécie *Copaifera reticulata* também apresentou eficiência contra o protozoário *Leishmania amazonensis* (SANTOS, 2008; SANTOS, 2011; SANTOS, Adriana et al., 2013) e sobre as formas amastigota e promastigota do *Leishmania chagasi* (RONDON et al., 2012). Soares et al., (2013), atribui o efeito contra leishmaniose ao componente Trans- β -cariofileno dos óleos (*Copaifera* spp.).

O óleo e seus derivados também tem sido utilizados como inseticida agindo contra as espécies de culicíneos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (CASTRO JÚNIOR, 2008) sendo também larvicida para os mesmos (SILVA; ZANON; SILVA, 2003). Também foram evidenciados através do estudo da sua atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos da *C. reticulata* Ducke, que visou o controle do *A. aegypti* que as concentrações usadas foram extremamente letais.

Abed et al., (2007), quando estudou as alterações morfohistológicas de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a tratamento com óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) mostrou eficiência contra o seu desenvolvimento, atribuindo ao óleo ação larvicida.

No ano seguinte (GERIS et al., 2008) estudou a ação larvicida de diterpenos da *Copaifera reticulata* Ducke e concluiu que ácido 3- β -acetoxilabdano-8(17)-13-dien-15-oic e o ácido alepterólico encontrados nesta espécie são os componentes mais tóxicos para as larvas; esses estudos foram mais uma vez confirmados, uma vez que até tanino da madeira e derivados do óleo desta espécie tem sido usado no combate a este mosquito (VALOTTO, 2009; VALOTTO et al., 2014), cujo transmite não apenas a dengue, mas também doenças como a zika, a chikungunya e a febre amarela (SUVISA-GO, 2016).

Verificou-se que na administração do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke em ratos aumentou parâmetros convencionais dos braços abertos e medidas etológicas (elevação, olhando para fora e acabar com atividade de braço aberto) em modelo animal de experimentação comportamental labirinto elevado, onde nenhuma mudança foi observada, o que sugeriu pelas análises que o óleo apresenta efeito ansiolítico (CURIO et al., 2009; SOUSA et al., 2015).

O óleo foi avaliado quanto a sua ação antiinflamatória em camundongos swiss webster e mostrou eficiência a partir da dose de 500mg (MUNIZ, 2009). Aspectos químicos do óleo resina de copaíba provenientes de diferentes espécies e de suas respectivas frações foram analisados e apresentou efeito antiinflamatório em diferentes modelos murinos de estudo (edema de pata induzido por carragenina, nistatina e miconazol; inibição de formação de tecido granulomatoso e dermatite induzida pelo óleo de cróton); as amostras do óleo da *C. reticulata* Ducke resultaram após destilação, em aproximadamente 64% de sesquiterpenos (β -elemeno, β -carofileno, α -bergamoteno, α -guaieno, β -farneseno, α -humuleno, valenceno, α -aromadendreno, α -selineno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno, α -bisaboleno, cedrol, cubenol) e 36% de diterpenos (16-caureno, caurano, clerodanoato de metila, labdanoato de metila, cativato de metila, caurenoato de metila, copalato de metila, cauranoato de metila, labdadienoato de metila, danielato de metil, pinifolato de dimetila, agatato de dimetila) (RIO, 2001).

Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba via vaginal, mostraram uma

tendência ao espessamento progressivo do epitélio do colo uterino (BRITO et al., 2000).

Em modelo murino de pleurite induzida por zymosan, o óleo da espécie *C. reticulata* obtida na região do município de Belterra no Pará, mostrou agir na inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoniais de camundongos, inibindo também neutrófilos e leucócitos com uma dose de 400mg/kg, efeito similar ao tratamento com diclofenaco 100mg/kg (VEIGA JÚNIOR et al., 2007).

O óleo (*C. reticulata* Ducke) também apresentou resultados com efeito antinociceptivo, provavelmente mediado por receptores opióides e atividade antiinflamatória através da inibição das vias histaminérgicas e serotoninérgicas (GOMES et al., 2007; GOMES et al., 2010).

Estudos com a *C. reticulata*, estimaram o seu potencial tóxico, onde foram determinadas as doses a serem utilizadas e não foram verificadas nem morbidade nem mortalidade em nenhum dos animais usados para o teste até a dosagem de 2000mg/kg, não apresentando efeitos nefrotóxicos, nem efeitos neurotóxicos (SACHETTI et. al., 2009). Quando utilizado no tratamento de neurodesordens, o óleo desta espécie induz a preservação dos tecidos e diminuição do recrutamento neutrófilos e células da glia, sugerindo que o óleo induz a neuroproteção através da modulação da resposta inflamatória após dano agudo no sistema nervoso central (GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). Este efeito foi confirmado através do tratamento com o óleo em animais depois de isquemia no córtex motor induzida por endothelina-1, onde se observou a redução da atividade antiinflamatória, com repercussões no melhoramento do comportamento e do desempenho dos animais no aspecto locomotor, fixando-o como um fator de neuroproteção (SOUSA et al., 2013).

Em Veiga et al., (2007), observou-se que o óleo (*C. reticulata* Ducke) não foi citotóxico para macrófagos obtidos do peritônio de camundongos Balb/c até a dose de 500µg/mL, enquanto que para outras espécies do óleo a citotoxicidade foi exibida com 50µg/mL.

O óleo desta espécie apresentou efeitos quimiopreventivos: usado por via oral (40 e 80mg/kg) em ratas com lesões pré-neoplásicas no cólon de ratas induzido por 1,2 dimethylhydrazine mostrou efeito protetivo contra a carcinogênese do cólon dos animais (SENEDESE et al., 2015). O óleo *reticulata* também apresentou inibição

tumoral em modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida (PEDREIRA, 2007).

Pesquisas sugerem a capacidade antitumoral do diterpeno caurano por inibir o fator nuclear κB (NF- κB) (CHICARO, 2009) que é responsável pela regulação de genes envolvidos nos processos de proliferação e sobrevivência celular e pela capacidade de indução da expressão de proteases envolvidas na apoptose (GHOSH; MAY; KOPP et al., 1998).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citotóxico do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke *in natura* e de sua fração resina em linhagens de células não cancerosas (E10) e cancerosas (E9) de pulmão de camundongo, uma vez que podem reduzir a tumorigenicidade de células neoplásicas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o processo de obtenção e fracionamento do bálsamo da *Copaifera reticulata* Ducke;
- Caracterizar os ácidos graxos do óleo através da avaliação de sua composição e determinação das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa;
- Determinar a citotoxicidade do óleo e da fração resina a partir do tratamento das células do cultivo e ensaio colorimétrico;
- Quantificar apoptose das Células E10 e E9 por fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÓLEO DE COPAÍBA (*C. Reticulata* Ducke)

Uma alíquota do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke foi gentilmente cedida pelo Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Prof. Dr. Osmar Alves Lameira.

O material possui o Registro (Exsicata) 183939 no Herbário Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém, estado do Pará cujo Banco de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas está credenciado como fiel depositário junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético-CGEN por meio do aviso de credenciamento No. 034/2010/SECEX/CGEN publicado no D.O.U. No. 189, de 01.10.2010, Seção 3, página 183, bem como, o projeto "Coleta, conservação, caracterização, documentação e uso de plantas medicinais e aromáticas de ocorrência na Amazônia Oriental", devidamente autorizado: Autorização de acesso para fins de Pesquisa Científica - Processo 02001.010413/2009-64 inclusão de projetos na Autorização Especial de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético junto ao IBAMA.

O óleo foi extraído da árvore da *C. reticulata* Ducke encontrada no quilômetro 67 da Floresta Nacional do Tapajós, uma área aproximada em 545 mil hectares na Região do Médio Amazonas, que foi criada com o Decreto nº. 73.684 de fevereiro de 1974. Está localizada nos municípios paraenses de Belterra, Aveiro, Rurópolis e Placas. Hoje segue sob a administração do IBAMA e tem seu acesso restrito pelo Rio Tapajós ou pela BR-163 saindo da cidade de Santarém.

4.2. LINHAGENS E ORIGEM DAS CÉLULAS

As linhagens de células E10 (figura 15) e E9 (figura 16), são células epiteliais de pulmão de camundongo, sendo uma célula normal e outra cancerosa. Quando foram explantadas pela primeira vez de pulmão de camundongos BALB/c, foram denominadas NAL-1 (RRID:CVCL_R787) (EXPASY, 2017), atualmente seus clones são chamados de E10. As células E9, são células que sofreram transformação espontânea. Esta transformação ocorreu depois do cultivo das células originais NAL-1A com Dexametasona. Pela ação da substância droga, sua proliferação foi inibida e

apenas células resistentes sobreviveram, as quais continuaram a serem cultivadas e depois caracterizadas como células tumorais (MALKINSON et al., 1997).

Figura 15. Célula não tumoral de pulmão de camundongo (E10). Aumento 40x.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 16. Célula tumoral de pulmão de camundongo (E9). Aumento 40x.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento I

- A. Teste de Solubilidade e pureza do óleo (*C. reticulata* Ducke)
- B. Fracionamento por Hidrodestilação
- C. Perfil dos Ácidos Graxos

Experimento II

- A. Cultivo Celular
- B. MTT (viabilidade celular)
- C. Morte Celular (taxa de apoptose)

4.4. EXPERIMENTO I

4.4.1. TESTE DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA

Para a realização do teste de solubilidade e pureza do óleo segundo Vasconcelos e Godinho (2002), foi misturada uma parte de óleo de copaíba para duas partes de álcool etílico absoluto. Quando o óleo é puro, sem nenhuma adulteração não ocorre separação de fases, o contrário ocorre quando a amostra pode estar adulterada, principalmente pela presença de ácidos graxos de outras origens, tal como óleo de soja.

Desta maneira, com a ajuda de tubo falcon de 15mL, depositamos 1mL de óleo *in natura* de copaíba e 2mL do álcool etílico absoluto. Com um vortex ocorreu a mistura.

Figura 17. Teste de Solubilidade do óleo (*C. reticulata* Ducke).

Legenda: Fase antes da mistura (óleo de copaíba e álcool etílico PA, 1:2).

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

4.4.2. FRACIONAMENTO DO ÓLEO POR HIDRODESTILAÇÃO

Para obter a fração resina do óleo utilizamos a técnica de hidrodestilação (Sovová; Aleksovski, 2006) adaptada ao aparato de Clevenger (figura 18), onde o processo é constituído por um destilador, um condensador e um separador. O destilador é o equipamento onde se deposita em imersão as partes da planta em água em ebulição no banho-maria. A fase de vapor é composta por vapor de água e óleo essencial que flui ao condensador, lugar onde ocorre há a formação de duas fases, água e óleo. Depois, as fases são levadas ao funil separador, situação em que o óleo por ser menos denso, flutua sobre a água, daí então o óleo essencial é obtido. O que sobra no balão volumétrico é resina.

Esta técnica é normalmente utilizada para destilar substâncias que se decompõem próximas a seu ponto de ebulição, que sejam insolúveis tanto em água quanto em seus vapores de arraste (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

Figura 18. Hidrodestilação.

Legenda: A Óleo da *Copaifera reticulata* Ducke. B Processo de Hidrodestilação. C Separação da fração volátil da água.
Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Este experimento foi realizado no Laboratório de Imunologia de Parasitas (LIP) da FZEA-USP, onde 40mL de óleo de copaíba *in natura* foram colocados em um balão volumétrico junto a 100mL de água destilada. Em seguida iniciou-se o aquecimento do banho-maria no qual o conteúdo do recipiente (óleo e a água) foram mantidos por 2h em temperatura média de 76,3°C. O produto da destilação foi submetido em seguida, ao funil separador. As frações obtidas foram acondicionadas em frascos âmbar.

4.4.3. ANÁLISE DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise consistiu na determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de copaíba. A amostra do óleo *in natura* foi analisada no (Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais da FZEA-USP) e foi dividida em duas etapas:

Etapa I (Esterificação):

Para o preparo da amostra da análise do perfil de ácidos graxos, foi necessário realizar a reação de esterificação para que se analisassem os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). A saponificação do óleo bruto de copaíba e a esterificação dos ácidos graxos foram feitas de acordo com os procedimentos do método 996,06 (AOAC, 1995). Nesta reação, 50mg deste óleo foram pesados em balança analítica (Shimadzu AUY220, Tokyo, JP) e misturados com 4mL de solução

0.5N de hidróxido de potássio (Êxodo Científica, Hortolândia, BR), agitados por 30s e colocado em banho-maria (Yamato Scientific BM-41, Tokyo, JP) a 90°C por 4min, em seguida a esta solução foi adicionado 4mL de complexo de trifloreto de boro metanol (BF₃) (Sigma- Aldrich, Louis, USA), e agitado por 30s.

Esta mistura foi novamente colocada em banho-maria a 90°C por 4min e resfriada. Ao final, 4mL de cloreto de sódio (Êxodo científica, Hortolândia, BR) saturado foram adicionados e agitado por 30s e finalmente 5mL de hexano (Supra solv®, Darmstadt, GE) com agitação de mais 30s. Após repouso para separação de fases, o sobrenadante foi transferido a um vial.

Etapa II (cromatografia):

As soluções de ácidos graxos transformados em ésteres metílicos foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia de Härtig (2008) (figura 19).

Figura 19. Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas. Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da FZEA-USP.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Foram utilizadas as seguintes condições experimentais:

- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (QP 2010 Plus, Shimadzu, JP);

- Coluna capilar SP- 2560 (100m × 0,25mm id × 0,20µm df, bis-cianopropil polisiloxano) (Supelco, Bellefonte, EUA). Dimensão da coluna: 30m x 0,32mm (comprimento x diâmetro interno);
- Gás de arraste: Hélio a uma vazão de 2,0mL min⁻¹
- Razão de *Split*: razão de divisão (split) de 1:12,5. (com injeção automática);
- Temperatura do injetor: 250°C;
- Temperatura do forno: isoterma com temperatura de 100°C min⁻¹ seguida de taxa de 5°C min⁻¹ até 195°C
- Temperatura da coluna: 100 a 240°C (rampa de aquecimento com taxa de 4°C/min até 180°C e de 10°C/min até 240°C);
- Temperatura da fonte íons: 250°C;
- Temperatura da interface entre a coluna e a fonte de íons: 250°C;
- Energia de ionização: 70eV (ionizador de elétrons); quadrupolo
- Faixa de varredura de massas: 40 a 350m/z;
- Corte do solvente: 1min de corrida.

Na análise do óleo de copaíba foi utilizada uma rampa de aquecimento de gradiente, com programação da temperatura do forno por uma isoterma com temperatura de 100°C min⁻¹ seguida de taxa de 5°C min⁻¹ até 195°C. Na análise da composição do perfil de ácidos graxos do óleo de copaíba, as condições cromatográficas foram as descritas na metodologia. O tempo de análise foi de 47 minutos. O tratamento dos espectros foi feito utilizando o software GC/MS solutions v. 2.5 que possui como base de dados às bibliotecas NIST 08 e NIST 08s.

Figura 20. Esquema ilustrativo – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

4.5. EXPERIMENTO II

4.5.1. CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas para o experimento duas linhagens de células epiteliais de pulmão de camundongo, sendo uma linhagem não tumoral E10 (controle) e uma linhagem tumoral E9. Foram cultivadas da mesma maneira como descrito abaixo.

Para realizar o cultivo, estas células foram mantidas em nitrogênio líquido até sua utilização no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT) da FZEA-USP. O processo de descongelamento foi feito com o criotubo mantido a 37°C até o seu descongelamento parcial, para rapidamente ser homogeneizado com dez volumes de meio de cultivo CMRL1066 completo, ou seja, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de Glutamax e 1% de Antibiótico (10,000 U/mL *Penicillin* e 10,000 µg/ml *Streptomycin* – *Invitrogen* – *Carlsbad, CA, USA*). As células foram centrifugadas a 1200 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi re-suspendido em meio de cultivo CMRL1066 completo, colocadas em garrafas de cultivo e mantidas em estufa à 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Ao atingirem 80% de confluência eram tripsinizadas da garrafa com solução de tripsina 0,05% (*Trypsin-EDTA* (0.5%), no *phenol red* – *Invitrogen* – *Carlsbad, CA*,

USA) a 37°C por aproximadamente 5 minutos. Depois, as células eram lavadas em dez volumes de meio de cultivo completo e contadas. Para a contagem das células, 10 µl da suspensão celular eram diluídos em 10 µl de solução de Azul de Tripan (0,025%) e colocados em câmara de Neubauer para contagem e verificação da viabilidade celular no aumento de 100x em microscópio óptico comum.

4.5.2. TESTE DE CITOTOXICIDADE E ENSAIO COLORIMÉTRICO POR MTT

Para o teste de citotoxicidade depois dos resultados do experimento piloto realizado anteriormente em que os dados obtidos para a fração volátil não foram possíveis de serem determinados, percebemos que por ser volátil, outros testes seriam necessários para garantir a confiabilidade dos resultados.

Prosseguimos em determinar a citotoxicidade do óleo de copaíba e de sua fração resina. Foram realizados no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT) da FZEA-USP, para cada tratamento e para cada célula testes em triplicata (figura 21), sendo estes independentes, onde 100µL contendo 5×10^3 células, foram colocadas em placas para cultivo de 96 poços com meio de cultivo CMRL1066 completo e mantidas na incubadora com temperatura controlada e atmosfera umidificada (37°C e 7%CO₂).

Figura 21. Esquema ilustrativo Teste de Citotoxicidade do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke *in natura* e da fração resina.

Fonte: Adaptado de Rochetti (2015).

Após 24 horas de incubação, todo o meio foi retirado e oito diferentes concentrações dos extratos foram adicionadas em diluição seriada 1:1, sendo a concentração inicial [1µl/mL], depois as células foram incubadas por 48 horas.

Em seguida, a viabilidade das células foi analisada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (*Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide* – *Sigma Aldrich*). O MTT foi diluído em meio de cultivo DMEM (*GIBCO – Invitrogen*) em uma concentração de 5mg/mL.

Depois de diluído, 10µL foi adicionado por poço e as células foram novamente incubadas por 2 horas. Depois de 2 horas, o meio de cultivo foi retirado por inversão até que os poços estivessem totalmente secos, então foi adicionado 100µL da solução (Álcool Isopropílico + 0,04N HCl) (*Synth* – Brasil), para dissolver os cristais de formazan, que foram formados através da metabolização do MTT pelas mitocôndrias das células ativas.

4.5.3. QUANTIFICAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE POR TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO

Segundo Ribble et al. (2005), a microscopia óptica de fluorescência combinadas a corantes fluorescentes de DNA como o Laranja de Acridina e Brometo de Etídio são considerados métodos de escolha, uma vez que é simples, rápido e preciso.

O Laranja de Acridina é capaz de permear todas as células com membrana intacta corando seus núcleos de verde e o Brometo de Etídio só adentra as células quando ocorrem danos a membrana citoplasmática (FIGUEIREDO et al., 2010).

Dessa forma, é possível identificar células vivas com um núcleo verde normal, células com primeiros sinais apoptóticos com núcleo verde-claro podendo ter sua cromatina condensada ou fragmentada podendo apresentar-se laranja, enquanto células necróticas coram de laranja o núcleo ainda estruturalmente normal (figura 22) (RENVOIZÉ et al., 1998).

Figura 22. Quantificação da Taxa de Apoptose pela Técnica de Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. Legenda: (A) células em apoptose, (L) células viáveis e (N) células em necrose.

Fonte: Adaptado de Ribble et al. (2005).

As células E10 e E9 foram cultivadas em placas de 96 poços, os quais receberam 100µL cada, contendo 5×10^3 células e meio CMRL1066 completo e depois mantidas na incubadora com temperatura controlada e atmosfera umidificada (37°C e 7%CO₂).

Após 24h do início dos cultivos, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do óleo de copaíba *in natura* e de sua fração resina.

Depois de 48h do início dos tratamentos as células foram coradas com 8µl por poço da solução de 100µg/mL de laranja de acridina e 100µg/mL de brometo de etídio em PBS (figura 23) (RIBBLE et al., 2005), em seguida foram vistas e fotografadas sob o uso do microscópio invertido (ZEISS – Axio Vert A1), câmara acoplada (Axio can 503) e posteriormente contadas com o auxílio do Programa ImageJ.

Figura 23. Esquema ilustrativo Quantificação de Apoptose pela Técnica de Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio das células tratadas com o óleo da *Copaifera reticulata* Ducke *in natura* e com a fração resina.

Fonte: Adaptado de Rochetti (2015).

4.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do Teste de Citotoxicidade e Ensaio Colorimétrico foram obtidos utilizando o equipamento FLUOstar OPTIMA e os cálculos para encontrar a concentração de inibição dos 50% da viabilidade celular (IC50) através do *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad, EUA).

Os resultados da Taxa de Apoptose foram apresentados com média e desvio padrão, analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA (fator único) dos grupos em questão, considerando-se $p < 0,05$ através do Software Excel Microsoft Office 365.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO I

5.1.1. TESTE DE SOLUBILIDADE E PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA

O teste de solubilidade e pureza do óleo (*C. reticulata* Ducke) diluído em duas partes de álcool etílico absoluto foram satisfatórios uma vez que não houve formação de uma mistura heterogênea (com presença de fases). Com a mistura observamos que o óleo diluiu completamente homogeneizando-se com o álcool, diminuiu um pouco a sua viscosidade, mas não houve alterações em sua coloração e transparência, nem formação de fases. Quando o óleo de copaíba é puro, não ocorre separação (VASCONCELOS e GODINHO, 2002).

Figura 24. Mistura homogênea entre óleo e álcool etílico PA 1:2.

Legenda: Mistura sem formação de fases.
Fonte: (DOMINGUES, 2017).

5.1.2. FRACIONAMENTO DO ÓLEO DE COPAÍBA POR HIDRODESTILAÇÃO

No fracionamento o óleo de copaíba utilizamos a técnica de hidrodestilação através o aparato de Clevenger. A mistura heterogênea da água e do óleo foi aquecida e evaporou levando junto consigo os compostos voláteis do óleo para outro recipiente.

Desta forma, ao finalizar o processo e por serem mais leves, os óleos essenciais ficaram sobre a camada de água, facilitando assim a sua obtenção

através do uso do funil separador, o que resultou na fração volátil (aproximadamente 9mL) 22,5%.

O hidrolato foi descartado (água da mistura). A fração resina foi determinada pelo restante do óleo depositado inicialmente no balão volumétrico (cerca de 25mL) 62,5%.

Figura 25. Produto da Hidrodestilação.

Legenda: Frações do óleo de copaiba.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

5.1.3. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Neste caso, não foi possível identificar os compostos por comparação dos tempos de retenção dos componentes puros por falta de padrões injetados nas mesmas condições analíticas que o óleo essencial. Também não foi possível calcular os valores de Índices de Kovats, uma vez que os valores de índice de retenção dos componentes do padrão de alcanos (C_{10} - C_{40}) registrados não foram obtidos nas mesmas condições que o óleo de copaíba.

A figura 26 apresenta o cromatograma correspondente às melhores condições observadas: rampa de aquecimento com taxa de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 180°C e de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 240°C e corte de solvente em 1 minuto de corrida.

Nesta mesma figura o “cromatograma está reconstituído de todos os íons”, onde o tamanho do pico representa a magnitude de íons formados por elemento, que depende do grau de fragmentação do composto e sua concentração na amostra (HARRIS, 2008).

É importante mencionar que o sétimo pico não foi identificado como ácido graxo, podendo ser solvente ou outro composto não identificável nas condições

cromatográficas utilizadas quando comparado com as bibliotecas ou por serem identificados como componentes não naturais do óleo de copaíba (como hexano, por exemplo).

Figura 26. Cromatograma do Óleo de Copaíba.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

A Tabela 3 apresenta os componentes identificados por meio do critério utilizado, seus tempos de retenção e a porcentagem dos compostos. Como o óleo essencial é uma mistura complexa de centenas de componentes, foram identificados e apresentados apenas os componentes majoritários, ou de maior intensidade do sinal (maior grau de ionização).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do óleo de copaíba identificados em CG-MS e seus respectivos tempos de retenção e porcentagem dos compostos.

Nº do Pico	Ácido Graxo	TR (min)	% dos compostos
1	Ácido caprílico (C8)	15,470	2,05
2	Ácido cáprico (C10)	18,420	5,78
3	Ácido láurico (C13)	21,590	43,93
4	Ácido tetradecanóico (C14)	24,766	19,98
5	Ácido palmítico (C16)	27,975	11,99
6	Ácido esteárico (C18)	31,319	4,91
7	Ácido oleico (C18:1)	32,723	16,49
8	Ácido linoleico (C18:2)	43,422	0,16

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Através dos espectros dos íons apresentados nas figuras 27 a 34, pode-se observar que a maioria dos compostos formou o íon molecular no ionizador, sendo o ácido caprílico, ácido cáprico, ácido laurico, ácido tetradecanóico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linolênico. O íon molecular corresponde ao íon de maior massa molecular e é formado em moléculas que possuem grupo –OH ou insaturações (ligações duplas ou triplas) nas extremidades (como é o caso de todos os compostos que formaram íon molecular); essas figuras apresentam a comparação entre os espectros dos principais ácidos graxos obtidos para o componente analisado com os dados da biblioteca NIST.

Figura 27. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido caprílico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 94 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 28. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido cáprico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 96 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 29. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido láurico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 30. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido tetradecanóico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 96 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 31. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido palmítico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 32. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido esteárico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 95 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 33. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido oleico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 97 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 34. Comparação do espectro do componente analisado (a) e do composto ácido linolênico da biblioteca NIST (b). Similaridade: 94 %.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Verifica-se que os compostos apresentaram fragmentação adequada para identificação de íons, que foram comparados com os espectros das bibliotecas digitais. No entanto, os espectros característicos destes compostos apresentaram similaridade maior que 94%, com poucas divergências.

Em relação às massas dos compostos identificados, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido tetradecanóico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linolênico, observa-se que são muito próximas (ou iguais), variando de 41 a 298g-mol e ao alto peso molecular. Em geral, mesmo com estas características, a separação e identificação prévia dos ácidos graxos presentes na amostra do óleo de copaíba foram possíveis de identificar.

As massas moleculares dos ácidos graxos foram próximas ou iguais; alguns compostos formaram íon molecular e houve pouca fragmentação de componentes, o que implica na forte qualidade e pureza da amostra. Uma boa característica, já que os ácidos graxos essenciais são necessários para muitos processos de homeostasia do corpo, incluindo a manutenção da integridade de células e a síntese de compostos biológicos ativos.

5.2. EXPERIMENTO II

5.2.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE E ENSAIO COLORIMÉTRICO POR MTT

Conforme podemos observar (Gráficos 1 e 2) quando tratamos as células do cultivo com óleo de copaíba *in natura* observamos que a IC₅₀ é três vezes maior que a IC₅₀ da resina para as células E10 e que a IC₅₀ do óleo é aproximadamente três vezes menor que a IC₅₀ da resina para a linhagem de células cancerosas E9.

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade por ensaio colorimétrico com MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide) das células E10 e E9 tratadas com óleo *in natura* (*C. reticulata* Ducke).

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Gráfico 2. Avaliação da citotoxicidade por ensaio colorimétrico com MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide) das células E10 e E9 tratadas com a resina (*C. reticulata* Ducke).

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Quando comparadas as IC50 das células E10 com as células E9 tratadas com a fração resina, as doses são proporcionalmente muito próximas umas das outras o que diminui sua eficiência frente os resultados do óleo como antitumoral no cultivo.

Ao observarmos as IC50 das duas linhagens celulares no tratamento realizado com o óleo, percebemos que uma dose quase onze vezes menor é suficiente para inibir o crescimento das células cancerosas (Tabela 4), ou seja,

precisa-se de menos óleo *in natura* para determinar a IC50 de células cancerosas e de muito óleo para causar danos as células E10.

Tabela 4. Valores das IC50 (concentração inibitória) determinadas pelo Teste de Absorbância por ensaio colorimétrico com MTT.

	Óleo de Copaíba (OC) $\mu\text{L/mL}$	Fração Resina (FR) $\mu\text{L/mL}$
IC50 E10	0,3142 $\pm$ 10,15	0,0930 $\pm$ 5,24
IC50 E9	0,0287 $\pm$ 0,29	0,8002 $\pm$ 1,75

Legenda: Média e desvio padrão das IC50 em [$\mu\text{L/mL}$] dos respectivos tratamentos.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Os resultados mostram que o óleo *in natura* completo em sua composição agiu melhor como agente antitumoral que sua fração resina, que apesar da quantidade conhecida de diterpenos pró-apoptóticos como o caso dos cauranos foi citotóxica a células normais quase da mesma maneira que para às células de câncer. Acreditamos que alguma substância sesquiterpênica da fração volátil presente no óleo puro de certa forma interfere potencializando sua ação antitumoral e preservando a célula não cancerosa.

5.2.2. TAXA DE APOPTOSE POR FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO.

Os resultados da Taxa de Apoptose pela Técnica de Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio foram obtidos através do auxílio do Software ImageJ, (<https://imagej.softonic.com.br>) usado para contar as células.

Na figura 35, percebemos que os tratamentos com óleo de copaíba *in natura* diminuíram a quantidade de células não cancerosas (E10) apresentando valores significantes para $p < 0,05$ a partir das concentrações 0,08 $\mu\text{L/mL}$ e 0,4 $\mu\text{L/mL}$, C3 e C4 respectivamente.

Figura 35. Cultivo de células E10 tratadas com óleo de copaíba *in natura*, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.

Legenda: Concentrações aproximadas das IC50 do tratamento das células E10 com o óleo da *C. reticulata* Ducke utilizadas na Técnica de Fluorescência: (C1) [0,0032µl/mL]; (C2) [0,016µl/mL]; (C3) [0,08µl/mL] e (C4) [0,4µl/mL]. Onde “A” são células em apoptose e “L” são células viáveis.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Na figura 36, vemos as células E9 tratadas com óleo *in natura*, observamos que ocorre uma diminuição das células viáveis e um aumento da ocorrência de apoptose a partir da concentração 0,0016µL/mL (C2).

Figura 36. Cultivo de células E9 tratadas com óleo de copaíba *in natura*, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.

Legenda: Concentrações aproximadas das IC₅₀ das células E9 tratadas com o óleo da *C. reticulata* Ducke utilizadas na Técnica de Fluorescência: (C1) [0,0032µl/mL]; (C2) [0,016µl/mL]; (C3) [0,08µl/mL] e (C4) [0,4µl/mL]. Onde “A” são células em apoptose e “L” são células viáveis.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

No gráfico 3, observamos que o óleo agiu melhor como antiproliferativo do que a fração resina nas células cancerosas (E9) do que nas não cancerosas (E10) induzindo a morte celular por apoptose. Nenhuma célula necrótica foi observada.

Gráfico 3. Comparativo das Taxas de Apoptose (%) das Células E10 (A) e E9 (B) tratadas com óleo *in natura* da *C. reticulata* Ducke.

Legenda: “L” são células viáveis, “A” são células em apoptose. Os tratamentos das células E10 e E9 quando comparados ao grupo controle mostram valores com pouca variância (considerando $p < 0,05$), uma vez que os valores foram $p = 0,0024$ para o cultivo de E10 e para o cultivo de E9 $p = 0,0038$.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Nas figuras 37 e 38, respectivamente células E10 e E9 que foram tratadas com a fração resina, observamos que há um aumento na ocorrência de células apoptóticas desde a concentração mais baixa de $0,0032 \mu\text{L/mL}$ em ambos os cultivos.

Figura 37. Cultivo de células E10 tratadas com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.

Legenda: concentrações aproximadas das IC50 das células E10 tratadas com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke utilizadas na Técnica de Fluorescência das células: (R1) [0,0032µl/mL]; (R2) [0,016µl/mL]; (R3) [0,08µl/mL] e (R4) [0,4µl/mL]. Onde “A” são células em apoptose.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Figura 38. Cultivo de células E9 tratadas com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke, coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.

Legenda: concentrações aproximadas das IC₅₀ das células E9 tratadas com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke utilizadas na Técnica de Fluorescência: (R1) [0,0032µl/mL]; (R2) [0,016µl/mL]; (R3) [0,08µl/mL] e (R4) [0,4µl/mL]. Onde “A” são células em apoptose e “L” são células viáveis.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Ao compararmos o grupo controle que não recebeu tratamento [0,0µl/mL], com todas as células em tratadas com a fração resina, tanto para E10 quanto E9 percebemos a diminuição de células viáveis, aumento de células em apoptose e não observamos figuras necróticas.

No gráfico 4, podemos observar que a fração resina foi mais citotóxica para as células não cancerosas (E10) do que para as cancerosas (E9).

Gráfico 4. Comparativo das Taxas de Apoptose (%) das Células E10 (A) e E9 (B) tratadas com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke.

Legenda: “L” são células viáveis, “A” são células em apoptose. Os tratamentos das células E10 e E9 com a resina quando comparados ao grupo controle mostram valores com pouca variância, uma vez que $p = 0,0030$ do cultivo de E10 e do cultivo de E9 $p = 0,0005$.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

A figura 39 compara a ação do óleo *in natura* e da fração resina nas concentrações $0,08\mu\text{L/mL}$ (C3 e R3), $0,4\mu\text{L/mL}$ (C4 e R4) nos cultivos de células E10. Podemos observar nas imagens que em C3 [$0,08\mu\text{L/mL}$] tratada com o óleo, há um número maior de células viáveis do que com a fração resina na mesma

concentração; na concentração 0,4 μ L/mL de copaíba e de resina, observamos apenas figuras apoptóticas.

Figura 39. Comparativo dos cultivos de células E10 tratadas com o óleo *in natura*.

Legenda: (C3 = [0,08 μ L/mL] e C4 = [0,4 μ L/mL]), com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke (R3 = [0,08 μ L/mL] e R4 = [0,4 μ L/mL]), coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. “A” são células em apoptose e “L” são células viáveis.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Na figura 40, comparamos a ação do óleo *in natura* e da fração resina nas concentrações 0,08 μ L/mL (C3 e R3), 0,4 μ L/mL (C4 e R4) no cultivo de células E9. Verificamos que para as células cancerosas (E9) quando tratada com óleo *in natura* há diminuição de células viáveis e aumento do número de células em apoptose na concentração 0,08 μ L/mL, ao contrário do que acontece com a mesma dose no tratamento com a fração resina.

Figura 40. Comparativo dos cultivos de células E9 tratadas com o óleo *in natura*.

Legenda: (C3 = [0,08µl/mL] e C4 = [0,4µl/mL]), com a fração resina do óleo da *C. reticulata* Ducke (R3 = [0,08µl/mL] e R4 = [0,4µl/mL]), coradas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. “A” são células em apoptose e “L” são células viáveis.

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Observou que o óleo *in natura* age melhor como agente antiproliferativo em células neoplásicas do que sua fração resina; uma vez que é preciso uma dose menor de óleo para inibir a proliferação das células cancerosas do que para inibir as não cancerosas, além de ser necessário uma dose relativamente alta da fração resina para inibir a proliferação de células tumorais, cujo valor, no entanto, é extremamente próximo a dose necessária para inibir 50% das células não tumorais.

Nesse sentido, o óleo de copaíba *in natura* pode ser considerado menos citotóxico para as células E10 e mais citotóxico para as células E9 nas concentrações testadas. Portanto, mais seguro que a sua fração resina.

6. DISCUSSÃO

6.1. EXPERIMENTO I

O teste de solubilidade e pureza do óleo é uma técnica simples que analisa a formação de fases quando se mistura de álcool etílico 100%. Quando o óleo é puro, a mistura é homogênea e não se observam fases (VASCONCELOS; GODINHO, 2002) conforme observamos em nossos resultados.

Para obter frações de óleos vegetais a técnica de hidrodestilação tem sido muito utilizada, pois mostra eficiência na separação das amostras de óleos de copaíba (ALMEIDA et al., 2012). Para a amostra do óleo *C. reticulata* Ducke obtivemos duas frações, a volátil e a resina. A fração volátil deste óleo é rica em sesquiterpenos e a fração resina é rica em diterpenos (VEIGA JÚNIOR et al., 2007). As frações da espécie *Copaifera reticulata* Ducke já foram descritas (quadro 3) e (quadro 4).

Quadro 3. Ordem decrescente em porcentagem de compostos voláteis do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke. Floresta Nacional do Tapajós. Exsicata: 183939 Herbário EMBRAPA Amazônia Oriental.

Constituintes	%	Constituintes	%
β -cariofileno	37,6	β -chamigreno	0,9
β -bisaboleno	13,9	Ciclosativeno	0,9
(E)- α -bergamoteno	9,3	γ -curcumeno	0,6
α -humuleno + (E)- β -farneseno	5,3	γ -gurjuneno	0,6
β -selineno	4,9	α -copaeno	0,5
β -elemeno	3,3	α -gurjuneno	0,4
α -selineno	3,1	β -curcumeno	0,4
α -bulneseno	2,1	β -bisabolol	0,2
(Z)- α -bisaboleno	1,8	δ -elemeno	0,2
(E)- γ -bisaboleno	1,3	óxido de cariofileno	0,2
β -sesquifelandreno	1,1	epi- β -bisabolol	0,1
Aromadendreno	0,9	epi- β -santaleno	0,1

Fonte: Adaptado de Ziech et al.(2013).

Quadro 4. Constituintes Diterpênicos do óleo da *Copaifera reticulata* Ducke da região da Floresta Nacional do Tapajós. Sob Registro 61212 no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Constituintes	%
Não identificado	0,3
16-caurano	1,6
Não identificado	2,3
Não identificado	1,7
Metil caurenoato	3,9
Metil copalato	2,4
Metil kolavenato	3,4
Metil hardwickiato	2,3
Metil clorechinato	0,1
Dimetil agathato	1,5
Metil 2-acetoxy-copalato	1,4
Não identificado	1,2

Fonte: Adaptado de Veiga Júnior et al. (2007).

Quanto a análise do perfil dos ácidos graxos do óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) os resultados mostraram um cromatograma bem definido com picos altos e únicos.

É importante salientar que a identificação dos componentes por meio do equipamento CG-MS (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas) constitui em uma análise preliminar, sendo que outras formas de identificação podem ser empregadas como comparação dos tempos de retenção dos analitos com padrões, comparação de índices como Índice de Kovats e/ou Índice Aritmético.

Uma boa característica é que os ácidos graxos essenciais são necessários para muitos processos de homeostasia corporal, pois estão presentes nos sistemas de sinalização celular, não somente influenciam a composição das membranas celulares, mas também o metabolismo celular, sinais de tradução, a modulação da expressão gênica e podem regular a atividade e a produção de diferentes fatores de transcrição (LOTTENBERG, 2009), incluindo a manutenção da resposta imune (MAGNAN et al., 2015).

As massas moleculares foram próximas ou iguais; os compostos tiveram pouca fragmentação, o que implica na forte qualidade e pureza da amostra. Foi possível

identificar compostos que já demonstraram eficiência em diferentes aplicações terapêuticas.

Quadro 5. Ácidos Graxos e o Câncer.

Aplicações terapêuticas no câncer:	
Ácido esteárico	Inibe a formação de colônias tumorais testiculares, vesicais e de cólon (FERMOR et al., 1992);
Ácido cáprico	Inibe a produção de prostaglandina PGE2 por macrófagos (WU et al., 2009);
Ácido linoleico	Inibe a carcinogênese no cólon Reduz riscos e aumenta a eficácia da quimioterapia Modifica a resposta imune de células cancerosas Modula a inflamação, proliferação celular, metástase, apoptose e angiogênese (VILLANUEVA, MACH, 2011);
Ácido oleico	Induz apoptose no câncer de mama, promove o crescimento de células não malignas, inibe o crescimento de células malignas, suprime a expressão de HER-2, a catalase em células leucêmicas humanas, aumenta a atividade da caspase 3 em carcinoma (CARRILLO; CAVIA; ALONSO-TORRE, 2012);
Ácido caprílico	Reduz a viabilidade de células cancerosas colorretais, de pele e de mama (NARAYANAN et al., 2015);
Ácido palmítico	Reduz a viabilidade celular dose/dependente e aumenta a taxa de apoptose em células de mieloma humano (NAGATA et al., 2015);
Ácido láurico	Induz a ativação de NFK β e expressão de COX-2 em macrófagos (LEE; HWANG, 2001; WU et al., 2009).

Fonte: (DOMINGUES, 2017).

Outra função para os ácidos graxos é a encapsulação de substâncias ou compostos dentro deles (OMOLO et al., 2017; KIELER-FERGUSON et al., 2017), como exemplo o ácido láurico que representou a maioria dos componentes na amostra de óleo da *Copaifera reticulata* Ducke utilizada em nosso estudo. Este ácido foi usado para o transporte de paclitaxel para a entrega de substâncias hidrofóbicas em sítio específico e os resultados mostraram que ele pode ser usado como um sistema eficaz para a administração de fármacos direcionados para a quimioterapia do câncer (NAM et al., 2013).

A variação química na composição de resinas vegetais, pode influenciar a ação farmacológica e a toxicidade dos produtos que os possuam em suas composições, além de comprometerem a qualidade do material (LANGENHEIN¹⁴, 2003 apud SILVA; BASTILLOS, 2012).

¹⁴ LANGENHEIN, J. H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. **Timber Press**, Portland, 586p. 2003.

6.2. EXPERIMENTO II

Os resultados que avaliaram a espécie de óleo da *Copaifera multijuga* Haynes e suas frações em cultivos celulares de melanoma mostraram que os valores foram melhores para as frações do que para o óleo *in natura* (LIMA et al., 2003). Porém verificamos através do teste de citotoxicidade e do ensaio colorimétrico que o óleo *C. reticulata* Ducke em sua composição *in natura* age como agente antiproliferativo nas células de câncer, mais do que nas células não cancerosas em relação a resina.

Devido à complexidade natural da mistura de sesquiterpenos e diterpenos, eles podem interferir com o componente ativo por efeito sinérgico (GILBERT; ALVES, 2003). Uma vez que a ação sinérgica das substâncias pode ocorrer por adição (onde o efeito combinado de duas ou mais substâncias medicamentosas é igual a somatória dos efeitos isolados de cada um deles) ou por potenciação (quando o efeito de duas ou mais substâncias medicinais é maior que a soma dos efeitos isolados dos mesmos) (SPINOSA; GÓRNIK e BERNARDI, 2011), o resultado pode estar relacionado com o sinergismo das substâncias que compõe o óleo, assim como o composto ativo pode estar na fração volátil (presente no óleo *in natura*).

Estudos tem relacionado compostos diterpênicos com ação antitumoral em células humanas de adenocarcinoma mamário, células de melanoma murino, adenocarcinoma cervical humano, carcinoma hepatocelular humano, glioblastoma humano (ABRÃO et al., 2015) e em hepatócitos (RODRIGUES et al., 2009); assim como pelo aumento da expressão de genes apoptóticos e diminuição de genes anti-apoptóticos em células malignas de glioblastoma humano depois de tratamento com o ácido caurenóico; por inibir o crescimento de células leucêmicas e de colón (LIZARTE-NETO et al., 2013; COSTA-LOTUFO et al., 2002); além de outros derivados dos cauranos terem induzido apoptose outros tipos de células tumorais (HUESO-FALCÓN et al., 2010).

Os diterpenos cauranos são mais frequentes no óleo da espécie *C. reticulata* Ducke (VEIGA JÚNIOR et al., 2007), por isso esperava-se encontrar melhores resultados para a fração diterpênica (fração resina) do que para o óleo bruto (*in natura*).

Alguns óleos extraídos do Gênero *Copaifera* L., mostraram atividade antineoplásica quando diminuiu a viabilidade celular em carcinoma epidermóide bucal induzido, em estudo que avaliou a expressão da proteína NFκβ antes e depois

do tratamento com o óleo *in natura* (CHICARO, 2009) e também quando o mesmo promoveu a diminuição de tumores em modelo de carcinogênese bucal DMBA induzido em hamsters (PEDREIRA, 2007), mas quando verificaram o efeito do óleo de copaíba sobre carcinoma Walker 256 por meio da inoculação de célula tumoral em vagina e colo uterino de ratas, ocorreu o aumento da massa do tumor e perda de peso dos animais; o autor sugere que essa consequência tem relação com a alta dose administrada ([4,8mL/Kg]) (BRITO et al., 2010).

A quantificação de morte celular pela técnica de fluorescência foi eficiente e representativa. O tratamento demonstrou alterações nas células em relação ao grupo controle. Houve o aumento da apoptose e diminuição de células viáveis, nas diferentes concentrações e de acordo com as colorações verde e vermelha indicativos de integridade da membrana e do núcleo, este teste (RIBBLE et al., 2005) foi essencial, pois o protocolo proporciona uma boa avaliação para ensaios realizados em placas de cultivo de 96 poços. Através dele foi possível contar as células vivas (aderidas) e as mortas (células soltas), garantindo a autenticidade dos dados.

Os efeitos do tratamento em células murinas mostrou que em baixas concentrações o óleo de copaíba *in natura* age melhor como agente antitumoral, induz a morte celular apenas por apoptose mesmo em concentrações maiores.

Sabendo da existência de mais de 600 agentes tanto naturais, quanto sintéticos usados no tratamento de neoplasias, o óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) seria apenas mais um deles. O fato é que para ser considerado um agente quimiopreventivo ideal é preciso poder ser administrado via oral, não pode ser tóxico, deve ser altamente eficaz, ter baixo custo e ter seu mecanismo de ação conhecido (DAGLI e LUCAS, 2011).

Como em nossos estudos prévios o óleo *in natura* agiu como forte agente antitumoral pela capacidade de indução a apoptose em baixíssimas concentrações, destacamos que o desenvolvimento deste trabalho agrega conhecimentos e contribui para a busca de novas estratégias de intervenção nas neoplasias, além de ressaltar a necessidade da valorização e certificação científica das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos existentes e provenientes da flora amazônica brasileira. Desta maneira, o óleo de copaíba poderia junto com as terapias convencionais também ser usado como um adjuvante na quimioterapia do câncer,

resultando em efeitos colaterais menores permitindo assim a continuação do tratamento com menos dano ao paciente (LOURENÇO et al., 2014).

Desta maneira, o óleo poderia ser mais valorizado, uma vez que suas árvores têm sido devastadas por madeireiras e carvoarias principalmente da Amazônia Oriental. Isso serve de alerta para a preservação das espécies e de toda a biodiversidade. Mesmo com a existência de métodos de extração que não prejudicam as árvores, a maior parte do óleo que é vendido no Brasil é produto secundário do corte indiscriminado de árvores da floresta (VEIGA JR; PINTO, 2002).

Ainda é preciso identificar e descrever as substâncias que interagem com as células tumorais, assim como o seu mecanismo de ação. De forma tal, que haja segurança para sua aplicabilidade clínica e científica. Por este motivo é necessário lembrar também, que por ser parte de uma planta medicinal, ser livremente comercializado, ser utilizado na fitoterapia e ter seu consumo quase sempre desmedido, a administração inadequada pode resultar em problemas ao paciente, como aumento da recidiva e/ou da proliferação do tumor em função da relação de efeito dose/dependente e também levar à resistência das neoplasias frente as substâncias que o compõem.

Deste modo, estudos futuros serão necessários para maiores elucidações quanto a sua composição, padronização e utilização tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ação antineoplásica *in vitro* do óleo da *Copaifera reticulate* Ducke e sua resina foi evidente através deste estudo. O óleo *in natura* age melhor como antiproliferativo, altera a viabilidade celular e induz apoptose em células neoplásicas pulmonares de camundongo.

A continuidade desta pesquisa visa encontrar respostas que apoiem os números da leitura espectrofotométrica, bem como os resultados obtidos na fluorescência. A investigação para a descoberta do mecanismo de ação segue em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, R. A.; CAVASIN, G. M.; DA SILVA, H. H. G.; GERIS, R. ; GARCIA DA SILVA, I. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (*Diptera, Culicidae*) causadas pela atividade larvívora do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista De Patologia Tropical**, 36(1), 75-86, 2007.
- ABRÃO, F.; COSTA, L. D. A.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; CASTRO, P. T.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC: Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 443, 2015.
- ABREU, F. S. S. **Degradabilidade e digestibilidade de diferentes dietas para cordeiros confinados utilizando níveis crescentes de óleo de copaíba (*Copaifera* sp)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.
- ADZU, B.; BALOGUN, S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of the safety, gastroprotective activity and mechanism of action of standardised leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms., v. 175, 378-389, 2015.
- AGUILAR, C. A. L.; LIMA, K. R. D. S.; MANNO, M. C.; TAVARES, F. B.; SOUZA, V. P. D.; NETO, F.; LISBOA, D. Effect of copaiba essential oil on broiler chickens' performance. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 35, n. 2, p.145-151, 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-54, 2007.
- ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. C.; HERNANDES, L. C.; RAMOS, M. F. S.; ANTUNES, L. M. G.; 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.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Home**. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html> Acesso em: 29 de jun. 2016.

ANVISA. (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Perguntas Frequentes / Medicamentos. Medicamentos Fitoterápicos – Informações Gerais. Qual a diferença entre planta medicinal e fitoterápico? 2015. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acesso em: 23 de abr. 2016.

ANVISA. (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**: Requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico-sp-42924454/legislacao/2027-resolucao-rdc-no-14-de-31-de-marco-de-2010.html>>. Acesso: 29 jun. 2016.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. 178 p. Tese. (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

AZEVEDO, O. C. R.; SALVADOR WADT, P. G.; OLIVEIRA WADT, L. H. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: Embrapa, 2004. (Embrapa Acre. Documentos, 91).

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p. 431-441, 2005. DOI: 0.1016/j.lfs.2005.09.012.

BARBOSA, P. C. S. **Padronização de óleos de *Copaifera multijuga* Hayne por meio de técnicas cromatográficas**. 2012. Dissertação. (Mestrado em Química) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

BARDAJÍ, D. K. R.; DA SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; DE OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; BASTOS, J. K. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p.18-27, 2016.

BARI, C. C., SAMPAIO, F., CONDE, N., MOURA, L., JÚNIOR, V. V., BARBOSA, G.; BANDEIRA, M. F. Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 26, p. 497-501. 2016.

BARRALES, F. M.; REÁTEGUI, J. L. P.; GROBER, V. L.; FORTE, M. B.; QUEIROGA, C. L.; MARTINEZ, J. **Fractionation of Copaiba oleoresin (*Copaifera officinalis*) using supercritical CO₂**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Barrales/publications>. Acesso em 30 jun. 2016.

BARRETO JÚNIOR, A. G.; BISCAIA JUNIOR, E. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA, PINTO, A. C., CARVALHAES, S. F. DE e MACIEL, M. A. M. (2005). Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 719-722. doi: 10.1590/S0100-40422005000400028.

BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A., FREITAS, P. C., & ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101-109, 1988. doi:10.1016/0378-8741(88)90235-8.

BATISTA, Â. G., FERRARI, A. S., DA CUNHA, D. C., DA SILVA, J. K., CAZARIN, C. B. B., CORREA, L. C.; MARÓSTICA JÚNIOR, R. M. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food chemistry**, v. 197, p. 1153-1159, 2016.

BENTO, A. L. L. **Óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) como aditivo na dieta de bovinos: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal**. (Dissertação) 2016 (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

BMJ. Cell Lung Cancer Collaborative Group. Non-small Chemotherapy innon-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. BMJ: **British Medical Journal**, v. 311, n. 7010, p. 899-909, 1995.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R.; BATISTA, A. U.; SAMPAIO, F. C.; ALBUQUERQUE, A. J.; MORAES, M. C. ; OLIVEIRA, J. E. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid) polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 372-377, 2015.

BONOMI, P.D.; FINKELSTEIN, D. M.; RUCKDESCHER, J. C.; BLUM, R. H.; GREEN, M. D.; MASON, B.; HAHN, R.; TORMEY, D. C.; HARRIS, J. ; COMIS, R. Combination chemotherapy versus single agents followed by combination chemotherapy in stage IV non-small-cell lung cancer: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 1602-13, 1989.

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 Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 185-189, 2013.

BRAY, F.; REN, J. S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*. **Journal International Du Cancer**, v. 132, p. 5, p. 1133–45, 2013. DOI:10.1002/ijc.27711

BRENNAN, P.; HAINAUT, P.; BOFFETTA P. Genetics of lung-cancer susceptibility. **Lancet Oncology**, v. 12, n. 4, p. 399-408, 2011. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70126-1.

BRITO, M. V. H.; OLIVEIRA, R. V. B.; MORAIS, M. R.; MIRANDA, J. S. D.; REIS, J. M. C. Análise gástrica após administração de copaíba: estudo experimental em ratos. **Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, v. 20, n. 3, p.78-82, 2001.

BRITO, N. M. B.; BRITO, M. V. H.; CARVALHO, R. K. V.; MATOS, L. T. M. B.; LOBATO, R. C.; CORREA, S. C.; BRITO, R. B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 176-80, 2010.

BRITO, N.M.B. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.22, n.8, p.489-93, 2000.

BUNN, P. A. JR.; KELLY, K. New chemotherapeutic agents prolong survival and improve quality of life in non-small cell lung cancer: a review of the literature and future directions. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 1087-100, 1998.

CARLTON, W.; McGAVIN, M. **Patologia veterinária especial de Thonson**. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 571.

CASTRO JÚNIOR, L. C. **Perspectivas de uso e potencial de plantas no controle de culicíneos de importância em saúde pública** [manuscrito]. 2008. Dissertação. (Mestre em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2008.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; 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.

CHABNER, B. A., e ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

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. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

COOPER, W. A.; LAM, D. C. L.; O'TOOLE, S. A.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**, v. 5, n. S5, p. S479-S490, 2013. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234; 2002.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DeNICOLA, D. Os Pulmões e as Estruturas Intratorácicas. In: **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 17: p. 278-287.

CURIO, M.; JACONE, H.; PERRUT, J.; PINTO, A. C.; FILHO, V.F, SILVA, R. C. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Journal of Pharmamacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1105-10. 2009. doi: 10.1211/jpp/61.08.0015.

CUNHA, K. M. D. A. **Estudo de segurança farmacológica do ácido caurenóico, um diterpeno bioativo isolado do óleo resina de *Copaifera langsdorffii***. Dissertação. (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DAGLI, M. L. Z.; LUCAS, S. R. R. **Agentes antineoplásicos**. Capítulo 54. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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

DIAS, D. D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154-162, 2014.

DINIZ, S. P. S. S.; BONZANINI, F.; BUENO, M. A. S.; RODRIGUES, J. D. Efeito do bálsamo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) sobre a germinação de esporos de *Fusarium*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n.1, p. 60-62, 2002.

DISTRION. **Óleo de Copaíba**. Rio de Janeiro: Distrion, 2016. Disponível em: <www.distrion.com.br/amazonia/copaiba.html>. Acesso em: 21 de jun. 2016.

DOMINGUES, P. S.; VIEIRA FILHO, G. L.; MÁXIMO, H. Avaliação *in vitro* da ação do óleo *in natura* da *Copaifera reticulata* Ducke sobre colônias fúngicas de *Candida albicans*. In CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2013, CONIC/SEMESP, Campinas. Disponível em: <<http://conic-semesp.org.br/anais/files/2013/trabalho-1000015678.pdf>>. Acesso em: 22 de jul. 2016.

DOMINGUES, P. S.; MÁXIMO, H. **Avaliação *in vitro* da ação do óleo *in natura* da *Copaifera reticulata* Ducke sobre colônias fúngicas de *Candida albicans*.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais. Universidade Anhanguera. Leme, 2016.

DORNELES, F. S.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* in the Copaiba Oil: *in vitro* Test and in Mic Experimentally Infected with the Parasite. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1136, 2013.

DWYER, J. D.; The central American, west Indian, and South American species of *copaifera* (caesalpiniaceae). **Brittonia**, v. 7, n. 3, 143-172, 1951.

DWYER, J. D. Further studies on the New World species of *Copaifera*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 8, p. 179-187, 1954.

DUARTE, R. L. M.; PASCHOAL, M. E. M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, V. 32, n. 1, p. 56-65, 2006.

SEMINÁRIO DO PROJETO KAMUKAIA. MANEJO SUSTENTÁVEL DE PRODUTOS FLORESTAIS NÃO-MADEIREIROS NA AMAZÔNIA, 1.,. Rio Branco, 2008. **Anais....** Rio Branco: Embrapa, 2008.

ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 406-412, 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000400011>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, 28(12), 863-869. 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013001200009>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

EXPASY BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. Cellosaurus NAL1A (CVCL_R787). Disponível em: http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_R787. Acesso em: 19 jun. 2017.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 147, p.150-154, 2007. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.035. 2007.

FIGUEIREDO, E. R.; VIEIRA, I. J. C.; SOUZA, J. J.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; KANASHIRO, M. M.; CÔRTEZ, F. H. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmännii* (A. DC.), Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 675-681, 2010.

FONSECA A. A.; RÊGO M. A. V. Câncer de pulmão em Salvador e na Bahia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 175-183, 2013.

FREITAS, H. O. G. **Efeito da administração do óleo de copaíba sobre o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos: aspectos morfológicos**. 43f. 2006. Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, 2006.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

FUTIDA, H. T. **Efeito da homeopatia e da fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo de ratos: estudo morfológico e morfométrico.** Monografia (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2010.

GANDAVO, P. M.; História da Província de Santa Cruz a que vulgarmente chamamos Brasil. Lisboa: Oficina Antônio Gonsalvez, 1576. p. 18.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELM, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. Gc-ms profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.440, n. 2, p.170-8, 2013. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.021.

GERIS, R.; SILVA, I. G. D.; SILVA, H. H. G. D.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 25-28, 2008.

GHOSH, S., MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225.

GILBERT, B.; ALVES, L. F. Synergy in plant medicines. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 13-20, 2003.

GLOBOCAN, 2012. **Home**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 29 de jun. 2016.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; HOVELL, A. M. C.; LANDGRAF, R. G.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, n.1, p. 179-184, 2008.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. D. C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 177-183, 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.01.005.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 486–92, 2007. doi:10.1016/j.jep.2006.08.018.

GONÇALVES, E. S. **Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae)**. Tese. 2014. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

GUIMARÃES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; MOURA, L. S.; CARVALHO JR., R. N.; LAMEIRA, O.; GOMES-LEAL, W. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. Article ID 918174.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p.1-93, 2006. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008.

HÄRTIG, C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography-mass spectrometry database. **Journal of Chromatography A**, v.1177, n. 1, p.159-69, 2008.

HERRERO JÁUREGUI, C.; CASADO, M.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, R. C. M. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 674-85, 2011. doi:10.1002/cbdv.201000258.

HUESO-FALCÓN, I.; GIRÓN, N.; VELASCO, P.; AMARO-LUIS, J. M.; RAVELO, A. G.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; ESTEVEZ-BRAUN, A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1724-1735, 2010.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Tobacco Smoke and Involuntary Smoking**, v. 83, 2004. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/>>. Acesso em: 30 de jun. 2016.

IDEFLOR (INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL DO ESTADO DO PARÁ). **Lista de espécies e grupos de valor do conjunto de glebas Mamuru-Arapiuns**. Edital 001/2011, Anexo VIII.

IDEFLOR (INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL DO ESTADO DO PARÁ). **Autorização para exploração florestal**. SEMAS/PA de 20/05/2015. Disponível em: <<http://ideflorbio.pa.gov.br/wp-content/uploads/2015/10/MAMURU-UMF-III-Amazonia-Florestal-UPA-2015.pdf>>. Acesso em: 21 de jun. 2016.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INDEX KEWENSIS. **Supplement XX**. Oxford: Claredon Press, 1996. 346p.

ISHIDA, A. K. N.; AMARAL, M. A. C. M.; GURGEL, E. S. C.; SOUZA FILHO, A. P. Ethanol extract *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera reticulata* Ducke on *in vitro* growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 4., 2008, BELÉM. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

IZUMI, E. **Efeitos do óleo de copaíba e constituintes em *Trypanossoma cruzi***. 2010. 95 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

JILL, E. L.; JOHN, D. M. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. **Clinics In Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p 703–740, 2011. doi:10.1016/j.ccm.2011.08.003.

KLAUBERG, C.; VIDAL, E.; RODRIGUEZ, L. C.E.; BALTEIRO, L. D. Determining the optimal harvest cycle for copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresin production. **Agricultural Systems**, v. 131, p. 116–122, 2014.

KUETE, V.; EFFERTH, T. African flora has the potential to fight multidrug resistance of cancer. **BioMed Research International**, v. 2015. Article ID 914813. doi.org/10.1155/2015/914813.

KWAK, I.; TSAI, S. Y.; DEMAYO, F. J. Genetically engineered mouse models for lung cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 66, p. 647-663, 2004.

KWON, M. C.; BERNIS, A. Mouse models for lung cancer. **Molecular Oncology**, v. 7, p. 165-177, 2013.

LAMEIRA, C. N. **Atividade do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos**. 2007. Dissertação. (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

LANDIS, S. H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics 1999. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 49, n. 1, p. 8-31, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200775>>. Acesso em:.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. Q. O.; SILVA, J. A.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012. doi:10.3390/molecules17043866.

LEITE, A. C. P. **Neoextrativismo e desenvolvimento no estado do Acre: o caso do manejo comunitário do óleo de copaíba na reserva extrativista Chico Mendes**. 2004. Dissertação. (Mestrado em Agroecossistemas). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

LEMO, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; DE SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; DE ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 238-245, 2015.

LIMA, A. F.; LIMA, J. F. J. F. M. Utilização medicinal do óleo de copaíba: aspectos históricos e estudos atuais. **Pós Em Revista**, v. 5, n. 1, p. 332-6, 2012.

LIMA, F. E. O. **Óleo de copaíba (*Copaifera* sp) como aditivo para bovinos suplementados a pasto**. 2015. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

LIMA, L. C. P. As leguminosae arbóreas nas florestas estacionais do parque estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia: Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 61, n. 3, p. 441-466. 2010.

LIMA S. R.; VEIGA JR., 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: p. 1048-1053, 2003.

LISTA, M.; BES, F. C.; PEREIRA, J. R.; IKARI, F. K.; NIKAEDO, S. M. Excessiva demora no diagnóstico clínico do câncer de pulmão. Depende do médico, do paciente ou do sistema? **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 1, p. 6-9, 2008.

LIU, J.; JOHNSTON, M. R. Animal models for studying lung cancer and evaluating novel intervention strategies. **Surgical Oncology**, v. 11, n. 4, p. 217-227, 2002.

LIZARTE NETO, F. S.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, F. M.; NOVAIS, P. C.; PERIA, F. M.; OLIVEIRA, H. F.; CARLOTTI JR., C. G.; TIRAPELLI, L. F. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.46, p. 71-78. 2013. doi: 10.1590/1414-431X20121423.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-606, 2009.

LOURENÇO, A. C. S.; BARONEZA, J. E.; RAMOS, S. P.; MIGUEL, L. K.; JULIANI, L. C.; PIC-TAYLOR, A. ; SALLES, M. J. S. Effects of copaiba oil on cyclophosphamide-induced teratogenesis in mice. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3464-3473, 2014. doi:10.4236/ajps.2014.523362.

MALKINSON, A. M. ; DWYER-NIELD, L. D.; RICE P.L.; DINSDALE, D. Mouse lung epithelial cell lines-tools for the study of differentiation and the neoplastic phenotype. **Toxicology**, v. 123, n 1-2, p. 53-100, 1997.

MAIA, J. G. S.; VAREJÃO, M. J. C.; WOLTER FILHO, W.; MOURÃO, A. P.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e látives da Amazônia: I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera* (nota prévia). **Acta Amazônica**, v. 8, n. 4, 1978.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; KAPLAN, M. A. C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 833-838, 2005.

MARTINS DA SILVA, R. C.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, p. 455-476. 2008.

MATOS FILHO, A. **Árvores do Jardim Botânico**. Rio de Janeiro: Lidador, 1993. p. 67.

MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Herb-drug interactions in oncology: focus on mechanisms of induction. **The Oncologist**, v. 1, n. 7, p. 742–52. 2006. doi:10.1634/theoncologist.11-7-742

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, Article ID 365359. doi:10.1155/2011/365359

MELO JÚNIOR, M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v.35, n. 9, 1872-78, 2012. doi: org/10.1590/S0100-40422012000900030.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba-*Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. S.; SANT'ANNA, M. E. S.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida: uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v.7, n. 2, p. 61-67, 2009.

MUNIZ, J. W. C. **Estudo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos**. 2009. Tese. (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MUSSI, M. C. M. Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e da melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *porphyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação. **Diss. Universidade de São Paulo**, 2011.

NAIME, F. F.; YOUNES, R. N.; KERSTEN, B. G.; ANELLI, A.; BEATO, C. A. M.; ANDRADE, R. M.; CARRARA, M. P.; GROSS, J. L. Metastatic non-small cell lung cancer in brazil: treatment heterogeneity in routine clinical practice. **Clinics**. v. 62, n. 4, p. 397-404, 2007.

NATURAL SOURCING SPECIALISTS IN COSMECEUTICAL INGREDIENTES.

Copaiba oil. Oxford:, 2014. Disponível em:

<https://www.naturalsourcing.com/downloads/msds/MSDS_Copaiba_Oil.pdf> Acesso em: 21/06/2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999). **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000. doi:10.1039/a902202c.

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSAGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

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 Medicinais**, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; BATISTA, C. R.; BEZERRA, A. N. S. Produção sazonal do óleo-resina de *Copaifera reticulata* ducke no km 67 da Flona Tapajós-PA. In: Seminário de Pesquisas Científicas da Floresta Nacional do Tapajós, I., 2011, Santarém. **Anais...** Belém: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011a. p. 60-65.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; BATISTA, C. R.; FRANÇA, S. K. S. Avaliação antifúngica do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke proveniente da Flona Tapajós-PA. In: Seminário de Pesquisas Científicas da Floresta Nacional do Tapajós, I., 2011, Santarém. **Anais...** Belém: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011b. p. 71-76.

OLIVEIRA, L. G. S. **Estudo da suspensão do óleo de copaíba multijulga com nanopartículas de magnetitas substituídas**. 2015. Tese. (Doutorado em Química), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Regulatory situation of herbal medicines**: a worldwide review. Geneva: OMS, 1998.

PACHECO, C. C. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo de *Copaifera reticulata* Ducke**. 2014. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

PAIVA, L. A.; RAO, V. S.; GRANOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 62, p. 1, p. 73-78, 1998.

PEÇANHA, A. D.; FERREIRA, M. R. A.; GALVÃO, M. A. M.; SOARES, L. A. L.; STRAGEVITCH, L.; DANIELSKI, L.; "Fracionamento do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) utilizando diferentes métodos", p. 4797-4802 . In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20., Campinas. **Anais...** São Paulo: Blucher, 2015. v.1, n. 2. DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-1600-18479-142574.

PEDREIRA, E. M. **Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba *in natura* (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal**. 2007. Tese. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

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 Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C. M.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A. S.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36-38, 2012.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* huber ex ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 355-360, 2000.

PIRES, H. C. G.; LAMEIRA, O. A.; ISHIDA, A. K. N.; SILVA, C. T. B. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba sobre *Rhizoctonia solani* Kuhn. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19, SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 3, 2015. **Anais...** Belém: Embrapa, 2015.

RAMOS, M. F. D. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. Tese. 2006. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? **The AAPS Journal**, v. 11, n. 3, 2009.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v.14, n. 2, p. 111-120, 1998.

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.

RIDGE, C. A.; McERLEAN, A. M.; GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 30, p. 93-98, 2013.

RIO, R. G. W. **Atividade anti-inflamatória, toxicidade e fitoquímica do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e de suas respectivas frações**. 2001. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.

RISCH, A.; PLASS, C. Lung cancer epigenetics and genetics. **International Journal of Cancer**, v.123, n. 1, p. 1-7, 2008. doi: 10.1002/ijc.23605.

ROBBINS; COTRAN: **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROCHETTI, A. L. **Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

RODRIGUES, A. R.; TIRAPELLI, L. F.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R. Estudo da atividade antineoplásica do diterpeno ácido caurenóico em hepatócitos (HEP-G2). **17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Usp**. 2009.

RODRIGUES, L. **Anchieta e a medicina**. Belo Horizonte: Edições Apollo, 1934. p.361.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M. D.; ANDRADE-JÚNIOR, H. F. D.; CARVALHO, C. A. D.; MAGALHÃES, H. C. R. *In vitro*

efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. **Natural product extraction: principles and applications**. Londres: Royal Society of Chemistry, 2013. 500p.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico da copaíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19n. 4, p. 937-941, 2009.

SACHETTI, C.G.; CARVALHO, R.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; LAMEIRA, O.A. and Caldas, E.D. Developmental toxicity of Copaiba Tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) Oleoresin in Rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1080-1085, 2011.

SANTIAGO, K. B., CONTI, B. J., ANDRADE, B. F. M. T., DA SILVA, J. J. M., ROGEZ, H. L. G., CREVELIN, E. J.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 12-18, 2015.

SANTOS, A. O. **Investigação da atividade biológica do óleo de copaíba obtido de diferentes espécies de *Copaifera* spp.** 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SANTOS, A. J. DOS e GUERRA, F. G. P. Q. Aspectos econômicos da cadeia produtiva dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) na Floresta Nacional do Tapajós – Pará. **Floresta**, v. 40, n. 1, p. 23-28, 2010.

SANTOS, A. O. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade do óleo de copaíba contra *Leishmania amazonenses*.** 62f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2011.

SANTOS, A. O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 59–64, 2013. doi:10.1590/S0074-02762013000100010

SANTOS, E. C. G.; DONNICI, C. L.; CAMARGOS, E. R. S.; REZENDE, A. A.; ANDRADE, E. H. A.; SOARES, L. A. L.; ALMEIDA, M. G. Effects of *Copaifera duckei*

Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1032-1037, 2013.

SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; SCHNEIDER, T.; LOPES, L. Q. S.; AURICH, C.; GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 265-268, 2012.

SARKAR, S., HORN, G., MOULTON, K., OZA, A., BYLER, S., KOKOLUS, S., e LONGACRE, M. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21087–113, 2013. doi:10.3390/ijms141021087

SENEDESE, J. M., ALVES, J. M., DE SOUZA LIMA, I. M., 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, n. 1, 1472-6882. 2013.

SENEDESE, J. M.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K. Chemopreventive effect of *Copaifera reticulata* oilresin on 1,2dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in rat colon. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 8S, pag. E93. 2015.

SILVA, A. E. S. **Identificação e quantificação via técnicas cromatográficas de ácidos graxos com potencial farmacológico em frutos amazônicos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, A. G.; PUZIOL, P. F.; LEITÃO, R. N.; GOMES, T. R.; SCHERER, R.; MARTINS, M. L. L.; CAVALCANTI, L. C. Application of the essential oil from copaiba clinical trial. **Alternative Medicine Review**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2012.

SILVA, E. S. **Análise dos aspectos socioeconômicos, fito-demográficos, genéticos e físico-químicos da extração do óleo-resina de *Copaifera reticulata* em duas comunidades da Flona do Tapajós, Pará**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

SILVA, E. N.; SANTANA, A. C. SILVA, I. M.; OLIVEIRA, C. M. Aspectos socioeconômicos da produção extrativista de óleos de andiroba e de copaíba na

floresta nacional do Tapajós, Estado do Pará. **Revista. Ciência Agrária**, v.53, n.1, p.12-23, 2010.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. S.; LIMA, M. C. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.11, p.1621-1628, 2012.

SILVA, I. G.; ZANON, V. O.; SILVA, H. H. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 729-732, 2003.

SILVA, J. R. M. **Contribuição para o estudo da flora brasileira**. Rio de Janeiro: Jornal do Commercio, 1911. p. 81.

SILVA, M. A. D.; PEREIRA, A. C.; MARIN, M. C. C.; SALGADO, M. A. C. The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 5, n. 4, p. 169-73. 2013. doi: 10.4317/jced.51104.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A.: Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** ; v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016. 10.3322/caac.21332.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS; Editora da UFSC, 2010.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. D. S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** : eCAM, 2013, 761323. doi:10.1155/2013/761323

SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN, M.; SALLON, S. PAAVILAINEN, H.; SOLOWEY, E.; LORBERBOUM-GALSKI, H. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 721402, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/721402>.

SOUSA, A.A.V.O.; LIMA, F.D.; MACHADO, A. A.; VERA, M.O.; FERNANDES, L.M.P.; LIMA, R.R.; MAIA, C.D.S.F. Tissue and motor analysis of neuroprotective and anti-inflammatory/INS; effects of copaiba oil (*Copaifera reticulata* Ducke) after focal cortical ischemia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 333, p. e247, 2013. doi: 10.1016/j.jns.2013.07.957.

SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**. 2011. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUSA D. P.; HOCAYEN P. A. S.; ANDRADE L. N.; ANDREATINI, R. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**. v. 20, n. 10, p. 18620-60, 2015. doi: 10.3390/molecules201018620.

SOVOVÁ, H.; ALEKSOVSKI, S. A. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. **Flavour Fragrance Journal**, v. 21, p. 881-889, 2006.

SPORN, M. B.; DUNLOP, N. M.; NEWTON, D. L.; SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Federation proceedings**, v. 35, n. 6, p. 1332-8, 1976.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, p.537–543. 2002. doi:10.1038/nrc844.

SUTHERLAND, K. D.; BERNIS, A. Cell of origin of lung cancer. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 5, p.397-403. 2010.

SUVISA (SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS). **Doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti***. 2016. Disponível em: <<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/208807/doencas-transmitidas-pelo-aedes-aegypti>> Acesso em: 26 de jun. 2016.

TEIXEIRA, R. K. C.; YAMAKI, V. N.; YASOJIMA, E. Y.; BRITO, M. V. H. Effect of copaiba oil in hepatic damage induced by acetaminophen in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 7, p. 526-530, 2013.

TSUJIUCHI, T., MORI, T., AMANUMA, T., TANAKA, N.; TSUTSUMI, M. Establishment and characterization of a rat lung adenocarcinoma cell line with low malignant potential. **Cancer letters**, v. 217, n. 1, p. 97-103, 2005.

VALOTTO, C. F. B. **Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens***

(Sapindaceae) e ao diterpeno da *Copaifera reticulata* (Leguminosae). 2009. Tese (Doutorado em Medicinas Tropicais). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

VALOTTO, C. F. B.; CAVASIN, G.; SILVA, H. H. G.; GERIS, R.; SILVA, I. G. Atividade larvica do ácido 3- β -acetoxilabdan-8(17)-13-dien-15-óico isolado da planta medicinal *Copaifera reticulata* (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciadas pelas alterações morfohistológicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, p.375-384, 2014.

VALVERDE, R. S. **Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos etanólicos de: *Cucurbita pepo*, *Remirea marítima* *Cayaponiatayuya*, *Eucalyptos citriodora*, *Cuminumcyminum* e Óleo Resina de Copaíba sobre leveduras do Gênero *Candida***. 2007. Dissertação (Mestrado em odontologia). Universidade Potiguar, Natal, 2007.

VASCONCELOS, A. F. F.; 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, 2002. doi: 10.1590/S0100-40422002000700002.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; ZUMINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 476-480, 2001.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JÚNIOR., V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M.G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba 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, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, 1997.

VIRIATO, E. P.; BIANCHETTI, E. S.; SANTOS, K. C.; VAZ, A. F.; CAMPOS, R. M. V.; PEREIRA, A. P.; BEZERRA, R. M.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Study

of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. **International Journal of High Dilution Research**, v.8, n. 26, p. 9-14, 2009

WANG, H.; KHOR, T. O.; SHU, L.; SU, Z. FUENTES, F.; LEE, J. H.; KONG, A. N. T. Plants against cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1281-1305, 2012.

WEICK, J. K.; CROWLEY, J.; NATALE, R. B. et al. A randomized trial of five cisplatin-containing treatments in patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 9, p. 1157-62, 1991.

WESTPHAL, F. L.; LIMA, L. C.; GUIMARÃES, R. A.; SOUZA, R. F. S.; COUTO, S. B.; NAKAJIMA, S. R. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de cajú e polivinilpirrolidona iodado (PVPI) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.34, n. 3, p. 170-176. 2007. doi:10.1590/S0100-69912007000300007.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer do pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.

ZHANG, X.; WU, J. Establishing of the Transplanted Animal Models for Human Lung Cancer. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 1, p.1-5, 2009.

ZIECH, R. E.; FARIAS, L. D.; BALZAN, C.; ZIECH, M. F.; HEINZMANN, B. M.; LAMEIRA, O. A.; VARGAS, A. C. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase* positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.7, p. 909-913, 2013.

ZIMMERMAM-FRANCO, D. C.; BOLUTARI, E. B.; POLONINI, H. C.; CARMO, A. M. R.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12561-12570, 2013.

ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H.; MARTINS DA SILVA, R. C.; TRIGO, J. R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n. 6, p. 501-503, 2009.