



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SHAYANNE VANESSA CORREIA HENRIQUES

**Avaliação do Potencial Citotóxico do óleo e Nanoemulsão de
Copaifera reticulata em Linhagens Celulares de Glioma**

**Macapá
2018**

SHAYANNE VANESSA CORREIA HENRIQUES

**Avaliação do Potencial Citotóxico do óleo e Nanoemulsão de
Copaifera reticulata em Linhagens Celulares de Glioma**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Deyse de Souza Dantas

Co-orientador: Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes

Macapá
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Bibliotecária: Thalita Ferreira (CRB2 – 1557)

615.32

H519a Henriques, Shayanne Vanessa Correia.

Avaliação do potencial citotóxico do óleo e nanoemulsão de Copaifera Reticulata em linhagens celulares de glioma / Shayanne Vanessa Correia Henriques ; orientadora, Dayse de Sousa Dantas; co-orientador, Madson Ralide Fonseca Gomes. – Macapá, 2018.

36 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Copaifera Reticulata - Copaíba. 2. Plantas medicinais - Estudo e análise. 3. Glioma. 4. Nanoemulsão. I. Dantas, Dayse de Sousa, orientadora. II. Gomes, Madson Ralide Fonseca, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

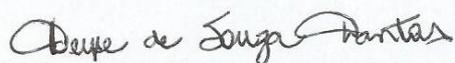
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Shayanne Vanessa Correia Henriques

Orientador(a): Deyse de Souza Dantas

Co-Orientador(a): Madson Ralide Fonseca Gomes



Dr Deyse de Souza Dantas / Presidente

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Dr Alessandra Azevedo do Nascimento / Membro Titular

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Dr Rafael Lima Resque / Membro Titular

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data:23/04/2018

Dedico este trabalho a minha mãe Shirlene.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Jesus Cristo, por iluminar meus caminhos e por serem a quem deposito toda a minha fé e fonte de força para realizar todos os feitos em minha vida.

A minha orientadora Deyse, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este projeto e por todos os conselhos nos momentos difíceis.

Ao meu coorientador Madson, por estar sempre presente, solícito e paciente em todas as etapas deste mestrado.

A minha mãe Shirlene, minha base e inspiração, por cuidar de mim com todo amor e não medir esforços em me apoiar e, tantas vezes, pensar em meu bem mais do que em si mesma e ter me suportado de perto ao longo deste período.

A minha madrinha Patricia, e sua família, por ter me acolhido com tanto amor e carinho em sua casa e ter me apoiado e aconselhado durante o período em que estive na fase experimental em Belém.

Aos meus irmãos Thiago, Alvaro e Janner, pelo apoio por terem aguentado todos os momentos difíceis.

Aos meus amigos Amanda, Dielle, Leide e Raimundo, pelos conselhos e por não deixarem meus ataques de ansiedade me vencer.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, em especial ao professor Edivaldo, por fornecer o espaço e equipamentos necessários para a realização in vitro desta pesquisa.

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	CÂNCER.....	12
1.1.1	Gliomas.....	13
1.1.2	Epidemiologia do câncer.....	13
1.2	TRATAMENTO.....	14
1.2.1	Plantas medicinais com ação antineoplásica.....	15
1.2.2	<i>Copaifera reticulata</i>.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
3	ARTIGO.....	19
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
4	REFERENCIAS.....	34
	LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	VIII
	LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IX

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Composição percentual de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenos do oleorresina da <i>Copaifera reticulata</i>	24
Tabela 2	Resultados do CRON, em cinco repetições: composição e pH, diâmetros de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.....	25
Figura 1	Efeito do tratamento com CRO (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µg mL ⁻¹) na viabilidade celular das linhagens AHOL-1, U87, U343 e AN27, após 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Cada coluna representa a média ± SD. *p<0.001 em comparação com o grupo controle, determinado pelo teste ANOVA/T-student	26
Figura 2	Efeito do tratamento com CRON (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µg mL ⁻¹) na viabilidade celular das linhagens AHOL-1, U87, U343 e AN27, após 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Cada coluna representa a média ± SD. *p<0.001 em comparação com o grupo controle, determinado pelo teste ANOVA/T-student	27

ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

AHOL-1	Linhagem celular de Astrocytoma Opher Loyola Hospital-1
AN27	Linhagem celular de fibroblasto humano
Coomflona	Cooperativa Mista da Floresta Nacional Tapajós
CRO	Óleo de <i>Copaifera reticulata</i>
CRON	Nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera reticulata</i>
DMEM	Dulbecco modification of. Minimum Essential Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Soro fetal bovino
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
U343	Linhagem celular de astrocitoma primário de humano adulto
U87	Linhagem celular de glioblastoma multiforme

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ÓLEO E NANOEMULSÃO DE *Copaifera reticulata* EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMA

Introdução: O câncer é uma das principais causas de morbi-mortalidade em todo o mundo, sendo os gliomas, os tumores malignos mais comuns do sistema nervoso central. Por essa razão, a pesquisa em produtos naturais de novos tratamentos teve um grande aumento no século XXI, principalmente devido à grande quantidade de efeitos colaterais dos tratamentos atualmente utilizados. **Objetivo:** Neste sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica do óleo de *C. reticulata* e sua nanoemulsão em células de glioma humano. **Material e Métodos:** O óleo de *C. reticulata* foi caracterizado após cromatografia gasosa acoplado a estectofotometro de massa. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de temperatura de fase e a citotoxicidade foi avaliada pelo método MTT. **Resultados e Discussão:** O composto mais abundante do óleo foi o hidrocarboneto sesquiterpênico β -cariofileno, sua nanoemulsão apresentou-se monodispersa, com manutenção das nanopartículas e de potencial zeta adequado. O CRON foi eficaz em todas as linhas celulares testadas (U87, U343 e AHOL-1) a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (38% a 45%), não tendo efeito significativo nas células saudáveis utilizadas (AN27). **Conclusão:** Os resultados apresentados, apesar de ainda necessitarem de mais estudos, mostram a possibilidade de um futuro uso da nanoemulsão de *Copaifera reticulata* no tratamento de câncer.

Palavras-chave: *Copaifera reticulata*, glioma, nanoemulsão, citotoxicidade.

Cytotoxic Potential Evaluation of the Oil and Nanoemulsion of *Copaifera reticulata* on Human Glioma Cells.

Introduction: Cancer is one of the mainly causes of morbidity and mortality worldwide of whom gliomas are the most common central neural system malign tumors. For that reason, the research of new treatments in natural products has been made a major increase in the 20th century, mostly because the large amount of side effects of the currently used treatments. **Objectives:** For that matter, this study aims to evaluate the cytotoxic activity of the *C. reticulata* oil and it's nanoemulsions on human glioma cells. **Methodology:** The *C. reticulata* oil was characterized after hydrodistillation followed by gas chromatography. The nanoemulsions were prepared by phase inversion temperature method and the cytotoxicity was evaluated by the MTT method. **Results and Discussion:** The most abundant compound of the oil was the sesquiterpene hydrocarbon β -caryophyllene and its nanoemulsions presented monodisperse, with maintenance of the appropriate zeta potential nanoparticles. The CRON was effective in all cell lines tested (U87, U343 e AHOL-1) at 50 μ g mL⁻¹ (38% to 45%) while having no significant effect in the healthy cell tested (AN27). **Conclusion:** The results presented in this, although still in need of more studies, show a possibility a future use in the treatment of cancer.

Keywords: *Copaifera reticulata*, glioma, nanoemulsion, cytotoxicity.

1.1 CÂNCER

O câncer, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA (2011), é o conjunto de mais de 100 doenças que tem a multiplicação desordenada das células como principal característica. Estas células possuem um processo de divisão agressivo e incontrolável, por este motivo chegam a invadir tecidos e órgãos ao seu redor, dando origem aos tumores, ou se espalhar pelo organismo, processo denominado metástase (principal causa nos casos de morte por câncer).

O câncer é denominado de acordo com o tipo de célula de sua origem, por exemplo, se o câncer se inicia a partir de uma linhagem celular epitelial ele é denominado de carcinoma, se iniciado de uma linhagem celular mesodérmica denomina-se sarcoma, linfoma se originado de células do sistema imunológico e leucemia se originado de células da medula óssea (SULTANA, 2014).

O organismo humano encontra-se exposto a múltiplos fatores carcinogênicos, com efeitos aditivos ou multiplicativos que agem de forma cumulativa e dose dependente. A carcinogênese pode ser iniciada de forma espontânea ou pela ação de agentes químicos, físicos ou biológicos, e conseqüentemente denominados agentes carcinogênicos. No entanto, ambos os casos citados resultam em uma indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas ou epigenéticas nas células (INCA, 2002).

A carcinogênese é um processo sequencial, dividido em 3 fases: a iniciação que consiste de um fator iniciador ou carcinogênico que causa dano ou mutação celular que permanecem latentes. A promoção, onde agentes promotores, denominados oncopromotores, que estimulam o crescimento da célula que sofreu mutação, e pode acontecer a qualquer momento após a transformação da célula inicial (INCA, 2002).

Quando expostos durante um período longo e continuado, estes oncopromotores, que podem ser agentes químicos ou biológicos como determinados vírus, promovem novas alterações nas células iniciadas às quais ao se acumular resultam em um aumento da capacidade proliferativa e da capacidade de contornar os mecanismos de controle do organismo, ou seja, uma célula iniciada é transformada em uma célula maligna de forma lenta e gradual, sendo que em muitos casos quando se interrompe o contato com o oncopromotor, interrompe-se este processo (TANAKA et al., 2013; DÓRIA, 2015).

A terceira e última etapa da carcinogênese é a progressão, que é caracterizada pela multiplicação descontrolada de modo irreversível, ou seja, mesmo quando se interrompe o contato com o agente oncopromotor o processo carcinogênico continua. As instabilidades genéticas, a perda do controle mitótica, invasão tecidual e metástase, assim como as alterações bioquímicas do metabolismo celular também são características desta etapa, assim como a angiogênese, que é essencial para a progressão neoplásica (ALMEIDA et al., 2005; TANAKA et al., 2013)

1.1.1 Gliomas

Os gliomas são os tumores cerebrais mais comuns em humanos (30-40% das neoplasias intracranianas), formados a partir das células gliais (células que fornecem suporte energético e nutricional aos neurônios), e variam de grau de agressividade e malignidade. Os glioblastomas multiformes são responsáveis por 50% destas incidências, e estão classificados como tumores de grau IV, pela classificação dos tumores do SNC da OMS, pois devido seu grau de indiferenciação, atipias e proliferação vascular, possuem um rápido crescimento, um alto grau de invasividade e aumentam a dificuldade de tratamento (TRINDADE et al., 2012; NØRØXE ET AL, 2017).

Os sintomas dos gliomas variam conforme o local do cérebro em que se desenvolvem, e podem incluir dor de cabeça, dormência, fraqueza, mudanças na personalidade, confusão e convulsões. O diagnóstico é realizado basicamente por exames neurológicos, tomografias computadorizadas e/ou imagem por ressonância magnética (utilizadas como forma de determinar forma, localização e tipo de tumor), assim como a biópsia (HANIF et al., 2017).

Os gliomas estão relacionados etiologicamente à fatores ambientais (exposição à radiação ionizante terapêutico, exposição a cloreto de vinilo ou pesticidas, o tabagismo, atividades de produção e refinamento do petróleo), no entanto alterações em genes imunológicos e alguns polimorfismos de nucleotídeo único também parecem contribuir (Mutações de CDKN2 e TP53 - 49 e 35%) (NØRØXE ET AL, 2017; WRENSCH ET AL., 2002).

1.1.2 Epidemiologia do câncer

Os tumores malignos estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e com 8.2 milhões

de mortes no ano de 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). A estimativa é que o número de novos casos cresça por volta de 70% nas próximas duas décadas. Entre os casos de câncer diagnosticados em 2012, os tipos mais comuns foram o câncer de pulmão, próstata, cólon e reto, estômago e fígado em homens e câncer de mama, colo de útero, pulmão e estômago em mulheres (WHO, 2014; ROLEIRA, 2015).

A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) da OMS, apontou que, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países (INCA, 2015).

No Brasil a mortalidade por neoplasias vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas, ao mesmo tempo que vem diminuindo as mortes por doenças infectoparasitárias assim, o INCA estabeleceu uma estimativa para o biênio 2016-2017 que aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer neste período, sendo os cânceres de próstata (aprox. 61 mil) e mama (aprox. 58 mil) os mais frequentes. A estimativa para a região amazônica em relação ao ano de 2016 é de 21.420 novos casos de câncer, onde os estados do Pará e do Amazonas estão em primeiro e segundo lugar quanto ao número de casos (INCA, 2015).

1.2 TRATAMENTO

Os tratamentos existentes mais comuns para o câncer incluem: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, cada uma com suas desvantagens próprias (COSTA-LOTUFO et al., 2010; TANG et al., 2012).

A cirurgia é um dos pilares principais no tratamento e controle do câncer, pode ser feita de forma preventiva, para diagnóstico, curativa, paliativa ou reconstrutora. Cirurgias preventivas são realizadas quando ocorre a retirada de tecidos que podem desenvolver câncer, por exemplo, a colposcopia em casos de lesões cervicais atípicas. As biópsias são procedimentos cirúrgicos necessários para a detecção da malignidade ou não de tumores e determina o manejo terapêutico correto do câncer. Cirurgias paliativas e reconstrutivas são necessárias para uma melhor qualidade de vida, sendo necessárias em determinados tipos de cânceres (SULLIVAN et al., 2015).

A cirurgia com objetivo curativo é realizada para a retirada do tumor canceroso, geralmente é feito quando o câncer ainda está na sua fase inicial, antes que realize metástase. No entanto, este tipo de remoção cirúrgica pode ativar, como resposta, uma multiplicação celular mais acelerada das células tumorais restantes (GURGAN et al., 2008; TANG et al., 2012).

A quimioterapia e a radioterapia possuem altos riscos e efeitos colaterais severos, como perda de cabelos, náusea e enjojo, infertilidade, podendo até desencadear o desenvolvimento de uma neoplasia secundária. Em alguns casos depressão do sistema imune e disfunção cognitiva também ocorrem após a realização destes tratamentos (TANNOCK et al., 2004; ONG et al., 2010, TANG et al., 2012).

1.2.1 Plantas medicinais com ação antineoplásica

Os efeitos colaterais dos tratamentos tradicionais são agressivos e são os principais responsáveis pela não adesão e consequente falha destes tratamentos. Em consequência, uma solução alternativa foi encontrada nas plantas medicinais, que são utilizadas para o tratamento de câncer na medicina popular (RASHID et al., 2002; SULTANA et al., 2014).

Produtos naturais da medicina popular vêm sendo utilizados por séculos em todas as culturas ao redor do planeta, que os utilizam para tratar doenças e manter a saúde. Cientistas vêm demonstrando um crescente interesse neste campo a medida que descobrem os benefícios à saúde advindos destes produtos. E as plantas medicinais demonstraram ser uma reserva de um grande número de compostos orgânicos de alto valor terapêutico que vêm sendo utilizado por muito tempo como fontes de medicamentos (SHARMA et al., 2011).

A pesquisa de produtos naturais, principalmente plantas e microrganismos, na área de oncologia teve um grande avanço no século XX, levando à descoberta de diversas substâncias antineoplásica que são utilizadas atualmente na terapêutica oncológica (NEWMAN; CRAGG, 2007). Um grande número destes isolados fitoquímicos derivados de plantas medicinais demonstrou produzir uma diminuição da proliferação celular, indução de apoptose, retardamento de metástase e inibição de angiogênese (MORTAZAVIAN et al., 2012; HOSSEINI; GHORBANI, 2015).

Cerca de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos nas últimas décadas, no mercado e de uso geral, são de origem em produtos naturais como: a vincristina e a vimblastina, a podofilotoxina e a camptotecina (CRAGG; NEWMAN, 2005; COSTA-

LOTUFO et al., 2010). O Instituto Nacional do Câncer dos EUA realizou testes com mais de 114.000 extratos de plantas procurando atividades anticâncer (SHOEB et al., 2006). Os constituintes químicos destas plantas induzem uma ação fisiológica no corpo humano e estudos clínicos e fitoquímicos têm comprovado o potencial anticâncer de muitas plantas contra diversos tipos de câncer (SHARMA et al., 2011).

No entanto, é interessante notar que nenhum isolado fitoquímico anticâncer derivado de plantas medicinais chegaram ao uso comercial ultimamente, porém um grande número de isolados fitoquímicos está na fase de desenvolvimento pré-clínico (CRAGG; NEWMAN, 2005). Existe uma necessidade de avaliar se estes isolados fitoquímicos e extratos realmente podem ser explorados para obter estes efeitos inibitórios sobre o câncer ou efeitos preventivos no corpo humano (SULTANA et al., 2014).

Esta avaliação demonstra-se necessária visto que alguns fitoquímicos derivados de determinadas plantas medicinais somente demonstraram efeitos benéficos no alívio de sintomas relacionados ao câncer (como anorexia, dor, náusea, fadiga) ou na qualidade de vida sem apresentarem resultados positivos nas ações antitumorais (BISWAL et al., 2013; HOSSEINI; GHORBANI, 2015).

1.2.2 *Copaifera reticulata*

O gênero *Copaifera* (Leguminosae) é pantropical e compreende 46 espécies, dos quais 37 são nativas da América do Sul e 9 da Amazônia Brasileira. No entanto 16 espécies são encontradas na Amazônia brasileira, assim como nas savanas centrais, incluindo *C. reticulata*, *C. multijuga*, *C. langsdorffii* e *C. cearensis* (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; SACHETTI et al., 2011).

O óleo-resina, extraído através de buracos feitos nos troncos das árvores de copaíba, é um líquido transparente cuja cor varia entre o amarelo e o marrom claro, sendo comercializado extensivamente no Brasil em forma de cápsulas ou óleo puro e utilizado pela medicina popular em diversas doenças, como dor de garganta, infecções pulmonares e urinárias, úlcera e como cicatrizante (CAVALCANTE et al., 2006; HERRERO-JAUREGUI et al., 2011; SANTIAGO et al., 2015).

Uma análise fitoquímica qualitativa realizada por Basille e colaboradores (1988) revelou a presença de triterpenos, ácido copálico e sesquiterpenos no óleo-resina da espécie *C. reticulata*, tendo como maiores componentes os triterpenos β -bisaboleno, β -cariofileno e β -cubeleno. Este óleo-resina possui propriedades medicinais, que são de extremo interesse das indústrias farmacêuticas e químicas, como atividade diurética,

expectorante, antisséptico, antiinflamatório e antimicrobiano que estão comprovadas na literatura (CARVALHO et al., 2005; HERRERO-JAUREGUI et al., 2011; SACHETTI et al., 2011; TINCUSI et al., 2002).

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica do óleo resina e nanoemulsão de *Copaifera reticulata* em células humanas de gliomas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o óleo resina de *Copaifera reticulata* (CRO);
- b) Identificar os constituintes do óleo de *C. reticulata*;
- c) Formular a nanoemulsão de *C. reticulata*;
- d) Caracterizar a formulação de nanoemulsão de *C. reticulata*.
- e) Avaliar a citotoxicidade utilizando as linhagens celulares AHOL-1, U87, U343 e AN27;

Submetido para publicação ao Brazilian Journal of Pharmacognosy

Cytotoxic Potential Evaluation of the Oil and Nanoemulsion of *Copaifera Reticulata* on Human Glioma Cells.

Shyanne V. C. Henriques,*¹ Raimundo A. Mira Neto,¹ Michel P. C. de Souza,³ Edivaldo H. C. de Oliveira,^{3,4} Elaine Cristina Pacheco de Oliveira,⁵ José O. C. Silva Júnior,⁶ Roseane. M. Costa,⁷ Madson R. F. Gomes,^{1,2} Deyse S Dantas^{1,2}

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, AP, Brazil

² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Farmácia – UNIFAP, Belém, PA, Brazil

³ Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética-SAMAN-Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, Brazil

⁴ Faculdade de Ciências naturais – ICEN – Universidade Federal do Para, Belém, PA, Brazil.

⁵ Laboratório de biotecnologia vegetal, Universidade Federal do Oeste do Para, Santarém, PA, Brazil

⁶ Laboratório de P&D Farmacêutico e Cosmético, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

⁷ Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

Correspondence: Shyanne Henriques* - shyanne_henriques@hotmail.com

Abstract: Cancer is one of the mainly causes of morbidity and mortality worldwide of whom gliomas are the most common central neural system malign tumors. For that reason, the research of new treatments in natural products has been made a major increase in the 20th century, mostly because the large amount of side effects of the currently used treatments. For that matter, this study aims to evaluate the cytotoxic activity of the *C. reticulata* oil and it's nanoemulsions on human glioma cells. The *C. reticulata* volatile oil was characterized after hydrodistillation followed by gas chromatography. The nanoemulsions were prepared by phase inversion temperature method and the cytotoxicity was evaluated by the MTT method. The most abundant compound of the oil was the sesquiterpene hydrocarbon β -caryophyllene and its nanoemulsions presented monodisperse, with maintenance of the appropriate zeta potential nanoparticles. The CRON was effective in all cell lines tested (U87, U343 and AHOL-1) at 50 μ g mL⁻¹ (38% to 45%) while having no significant effect in the healthy cell tested (AN27). The results presented in this, although still in need of more studies, show a possibility a future use in the treatment of cancer.

Keywords: *Copaifera reticulata*; glioma; nanoemulsion; cytotoxicity

Conflict of interest: All authors have none to declare

Introduction

Cancer is a group of more than 100 diseases that have uncontrolled multiplication of cells as main characteristic and can affect at different degrees of aggressiveness. The exposure of the human body to several carcinogenic factors, with addictive or multiplicative effects, that act cumulative and in a dose-dependent manner (Sultana, 2014). These carcinogenesis factors can be spontaneously initiated or may occur through the action of chemical, physical or biological agents, which induce mutagenic, non-mutagenic or epigenetic mutations of normal cell (Dória, 2015; Tanaka et al., 2013).

Among the various types of cancer, malign tumors is one of the mainly causes of morbidity and mortality worldwide, with nearly 8.8 million deaths in 2015, nearly one in six global deaths, and it is estimated that the number of new cases increases up to 70% in the next two decades (WHO, 2017). In Brazil, the cancer mortality have been rapidly increasing and the Brazilian National Institute of Cancer José de Alencar (INCA) estimated for the biennium 2016-2017, 420 thousands of new cases. The estimation for the Amazonic region is 21.420 new cases, which Pará and Amazonas are the states with the first and second places on the number of new cases at this biennium (INCA, 2015).

Considering this data, the gliomas are the most common central neural system malign tumors, formed from glial cells and has a high-grade category accordingly to WHO (grades III and IV) responsible for 2.5% of cancer deaths (Colquhoun, 2010; Hanif et al., 2017). They are notorious difficult to treat because it exhibit an aggressive invasive behavior that allows it to spread throughout the brain and the capability of immune system evasion, keeping low numbers of identifying antigens and recruiting suppressor cells (Colquhoun, 2010; Johansen, 2016; Walkins et al., 2014). The treatment options for this type of cancer frequently leads to local recurrence and the patient's prognosis are usually poor (Costa-Lotufo et al., 2010; Tang et al., 2012).

For that reason, the research of natural products, mainly plants and microorganisms, in the field of oncology had made a great advance in the 20th century, leading to the discovery of several antineoplastic substances that are currently used in cancer therapy (Cragg; Newman, 2007). A large number of these photochemical isolates derived from medicinal plants had demonstrated a decrease in cell proliferation, induction of apoptosis, delayed metastasis and inhibition of angiogenesis (Ghorbani; Hosseini, 2015; Mortazavian et al., 2012).

However, it is interesting to note that a very few phytochemical isolates derived from medicinal plants have reached the general use stage lately, despite a large number of phytochemical isolates are in the preclinical development phase (Cragg; Newman, 2005). There is a need to evaluate whether these phytochemical isolates and extracts will actually be the source of anticancer activities, or whether they can be exploited to obtain these inhibitory effects on cancer or preventive effects in the human body (Sultana et al., 2014). This evaluation is necessary because some phytochemicals only have beneficial effects on the relief of cancer-related symptoms (such as anorexia, pain, nausea, fatigue) or quality of life without positive results in antitumor actions (Biswal et al., 2013, Ghorbani, Hosseini, 2015).

Amidst popular medicinal plants in Amazon regions, the *Copaifera reticulata*, popularly known as copaiba, belongs to the Leguminosae family and it's found in Brazilian Amazon, including Amapá, Roraima and Para states (Costa, 2018). The oil, extracted from the trunk, has various traditional uses but it's primarily use in infections and has anti-inflammatory, antimicrobial, expectorant activities comproved in the literature (Bardaji, 2016; Herrero-Jauregui et al., 2011; Sachetti et al., 2011; Tincusi et al., 2002)

In an effort to enhance the pharmacokinetic of oil-based compounds, nanoemulsions, nanometric formulations, based on oil, water, and surfactants, can be used as carriers. These formulations has a long-term stability, high solubility of molecules and it's a promising tool in the development of pharmaceutical industry since can be used for new targeted and controlled released drugs (Gupta et al, 2016; Milhomem-Paixão et al, 2017).

The aim of this study was to develop nanoemulsions of *C. reticulata oil* and evaluate the it's cytotoxic actions on human glioma cells. This data was compared with the the copaiba oil in natura.

Materials and Methods

Plant material

The *Copaifera reticulata* oil (CRO) was collected of productive trees at Tapajós National Forest Joint Cooperative (Coomflona). It was obtained 100 mL of the oil, whose sample was sent to the Botanic Lab – Herbarium of East Amazon Embrapa for identification and ratification of the sample already identified by Coomflona (NID: 69/2011).

Oil constituents

The volatile fraction (92% of the CRO) was obtained by simple hydrodistillation with adjusted temperature at $110\pm 10^{\circ}\text{C}$ for 16 consecutive hours. Quantitative and qualitative analyses of volatile fractions of the CRO were performed in a Gas Chromatograph (HP 6890 GC System

(Hewlett – Packard)) coupled to Mass Spectrometer (HP Agilent 5975 MSD Transfer Line Heater). A HP-5 capillary column (HP Agilent 19091J-433; 30m×0.25mm×0.25µm) with 5% phenyl-poly (methylsiloxane) stationary phase was used and helium was employed as carrier gas (1.0 mL/min) with column inlet pressure of 8.21psi. The GC / MS analysis was performed using Split injection (40:1), injector temperature set at 220°C, and oven temperature of 60°C (5 min), with a heating rate of 3°C/min until a final temperature of 325°C was reached, and the temperature of the MS detector was maintained at 250°C. The mass spectra was obtained by electron impact (EI) at 70eV of energy. Identification of the compounds of the volatile fraction of CRO was done according to comparison of the mass fragmentation pattern (Adams, 2017) and retention indices (determined relatively to the retention times of a series of n-alkanes).

C. reticulata nanoemulsions formulation

The nanoemulsions were prepared by phase inversion temperature method (Izquierdo et al 2005). Firstly, the oily phase of the emulsion (5g of CRO volatile phase and 5g of Tween 80) were heated up to 60°C +/- 2°C. Then, the aqueous phase (ultra pure water) was also heated to the same temperature of the oily phase. After both phases reached the target temperature, the aqueous phase was slowly verted in the oily phase with a 5mL syringe, in the speed of 5 drops/minute, until complete the formulation of 50 mL. Lastly the nanoemulsions was cool of until reach the temperature of 25°C +/- 2°C.

Characterization of C. reticulata nanoemulsion (CRON)

For the characterization of the nanoformulation it was determined the droplet size, the polidispersion index and the zeta potential. For that, the formulation were diluted in distillated water (1:10) and then put into the Zetasizer® for reading at day one and day 30 after formulation. The obtained results were then shown as mean and standard deviation.

Cell lines and cell culture

The human glioblastoma cells (U-87, U-343 and AHOL-1) and the human fibroblast (AN-27) were obtained from Evandro Chagas Institute (Belém, Pará, Brazil). The cells used in this study were cultured in DMEM/F12 supplemented with penicillin G sodium (50 U/mL), streptomycin sulphate (25 U mL⁻¹), amphotericin B (2,5 µg mL⁻¹) 10% and gentamicin sulphate (25 µg mL⁻¹) supplemented with 10% FBS, at 37°C, a minimum relative humidity of 95% and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

The MTT assay

The cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96-well plates and grown for 24h. After the incubation time, the cells were washed in PBS solution and 100 μL of CRON and CRO oil at a range of concentrations (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were added and incubated for 72 h. At the end of this period, the medium was removed, and 100 μL of MTT solution (MTT 5 mg mL^{-1} in RPMI in 90% DMEM/10% FBS) was added to the cells and incubated for 1 h. The formazan crystals were dissolved with 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was quantified in 96-well plates (GloMax®-Multi, Promega) at 565 nm and the control group was cells without any addition and is referred to as 100% of viable cells

Results and Discussion

Twenty-five constituents were identified accounting for 92,34% of the oil collected on the dry season and the chemical composition of the CRO identified by RI (Retention Index) is presented in Table 1. The CRO was characterized by sesquiterpenes, being the most abundant compound the sesquiterpenes hydrocarbons: β -caryophyllene (39.91%), followed by α -bergamotene (11.34%), β -bisabolene (7.38%), germacrene D (5.84%), germacrene B (4.28%), α -humulene (3.15%), α -cadinene (3.19%), α -copaene (2.63%) and β -selinene (1.72%). It is also present the caryophyllene oxide (1.87%), an oxygenated sesquiterpene, product of metabolism of caryophyllene.

Table 1. Composition percentage* of sesquiterpenes hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes and monoterpenes hydrocarbons of the North Brazilian *Copaifera reticulata* oil.

Retention Index		Compounds	Composition Percentage* (wet season)	Chemical Formula
DB-5	Lit. (Adams, 2017)			
<i>Sesquiterpenes hydrocarbons</i>			84.79	
1399	1389	α -elemene	0.17	C ₁₅ H ₂₄
1353	1345	α -cubebene	1.04	C ₁₅ H ₂₄
1376	1374	α -copaene	2.63	C₁₅H₂₄
1405	1408	β -caryophyllene	39.91	C₁₅H₂₄
1411	1410	α -cedrene	0.45	C ₁₅ H ₂₄
1436	1411	α -bergamotene	11.34	C₁₅H₂₄
1445	1439	α -aromadendrene	–	C ₁₅ H ₂₄
1455	1436	α -humulene	3.15	C₁₅H₂₄
1480	1484	germacrene D	5.84	C₁₅H₂₄
1484	1479	α -curcumene	0.93	C ₁₅ H ₂₄
1485	1489	β -selinene	1.72	C₁₅H₂₄
1501	1500	bicyclogermacrene	0.22	
1510	1505	β -bisabolene	7.38	C₁₅H₂₄
1510	1513	δ -cadinene	2.54	C₁₅H₂₄
1538	1537	α -cadinene	3.19	C₁₅H₂₄
1561	1559	germacrene B	4.28	C₁₅H₂₄
1672	1674	cadalene	–	C ₁₅ H ₂₈
<i>Oxygenated sesquiterpenes</i>			7.24	
1577	1578	spathulenol	0.45	C ₁₅ H ₂₄ O
1580	1583	caryophyllene oxide	1.87	C₁₅H₂₄O
1593	1600	cedrol	2.43	C ₁₅ H ₂₆ O
1637	1630	eudesmol	–	C ₁₅ H ₂₆ O
1641	1559	α -muurol	0.52	C ₁₅ H ₂₆ O
1665	1652	α -cadinol	1.61	C ₁₅ H ₂₆ O
1811	1822	β -vetivone	0.39	C ₁₅ H ₂₂ O
<i>Monoterpene hydrocarbons</i>				
1524	1521	β -sesquiphellandrene	0.31	C ₁₅ H ₂₄

*Expressed by GC/MS analysis on DB5 column

The chemical composition found in the literature did not differ significantly with the composition found in this study. The β -caryophyllene, the main compound found on the majority of the literature, is followed by α -humulene, α -copaene, α -bergamotene and α -bisabolene, with different amounts in each study (De Souza, 2017; Dias et al., 2014; Lucca, 2015; Veiga Junior, 2007).

The major compound found in an oil is generally the responsible for its biological properties, in the case of CRO, the β -caryophyllene has comproved action as anti-inflammatory, anti-oedemic, antioxidant, antimicrobial and antitumor on several studies of the literature (Bakkali et al., 2008; Ghelardini et al., 2001; Gomes et al., 2013; Lima, 2003; Sahin et al., 2004; Shimizu et al., 1990).

Physicochemical properties of formulation

The nanoemulsion formulation was chosen because it facilitates the penetration and absorption of actives, since the small sized droplets and the fact that the lipophilic affinity of the particles, which enable the oil to reach the target size.

The CRON presented monodisperse ($0.226\pm 0,081$ a $0.271\pm 0,016$), with maintenance of the appropriate zeta potential (-31 to -36 mV) nanoparticles ($236.92\pm 48,80$ to $302.93\pm 2,46$ PD), which gave to the nanoemulsion a stable formulation for 30 days, at $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Table 2).

Table 2. CRON results, in five repetitions: composition and PH, particles diameters, polidispersion index and Zeta potential.

F	[]%			Ph	After 1 day			After 30 days		
	S	O	W		PD(nm)*	PdI*	ZP*	DP(nm)*	PdI*	PZ*
1 ^a	5	5	90	$5,54\pm 0,08$	$294,2\pm 7,5$	$0,243\pm 0,034$	- 34,26	$236,92\pm 48,80$	$0,226\pm 0,081$	- 35,83
2 ^a	5	5	90	$5,43\pm 0,05$	$287,6\pm 18,3$	$0,264\pm 0,016$	- 35,33	$277,58\pm 18,04$	$0,244\pm 0,018$	- 36,00
3 ^a	5	5	90	$5,38\pm 0,04$	$392,2\pm 10,6$	$0,153\pm 0,102$	- 34,90	$293,52\pm 11,88$	$0,231\pm 0,014$	- 34,60
4 ^a	5	5	90	$5,61\pm 0,03$	$340,5\pm 34,0$	$0,275\pm 0,010$	- 31,50	$253,86\pm 28,21$	$0,239\pm 0,020$	- 33,50
5 ^a	5	5	90	$5,43\pm 0,02$	$270,2\pm 11,0$	$0,247\pm 0,025$	- 30,00	$302,93\pm 2,46$	$0,271\pm 0,016$	- 31,33

F: formulation; S: surfactant Tween 80; O: *C. reticulata* oil; W: ultrapure water; PD: particle diameter; nm: nanometer; PdI: Polidispersion Index; ZP: Zeta Potential. Maintained at $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. The experiments were carried out in triplicate. Each column represents the mean \pm SD*.

The properties studied at this topic may be used as indicators of an emulsion stability and the values found on this study is similar with the formulations found by Dias et al (2014) and by Lucca et al (2015) when utilized the same methodology. Although higher values were found when utilized others methodologies, the phase-inversion temperature method were the chosen one because of the fact that has an easily performed scale results in small and uniform droplet size if done correctly.

Cell Viability

About 85% of the composition of CRO is sesquiterpenes hydrocarbons, which gives a highly lipophilic profile to this oil, and allows it to pass through the cell walls and its cytoplasmic membranes and permeabilize them, a characteristic that is essential to a compound present a cytotoxic activity (Bakkali et al., 2008; Bruni et al., 2003).

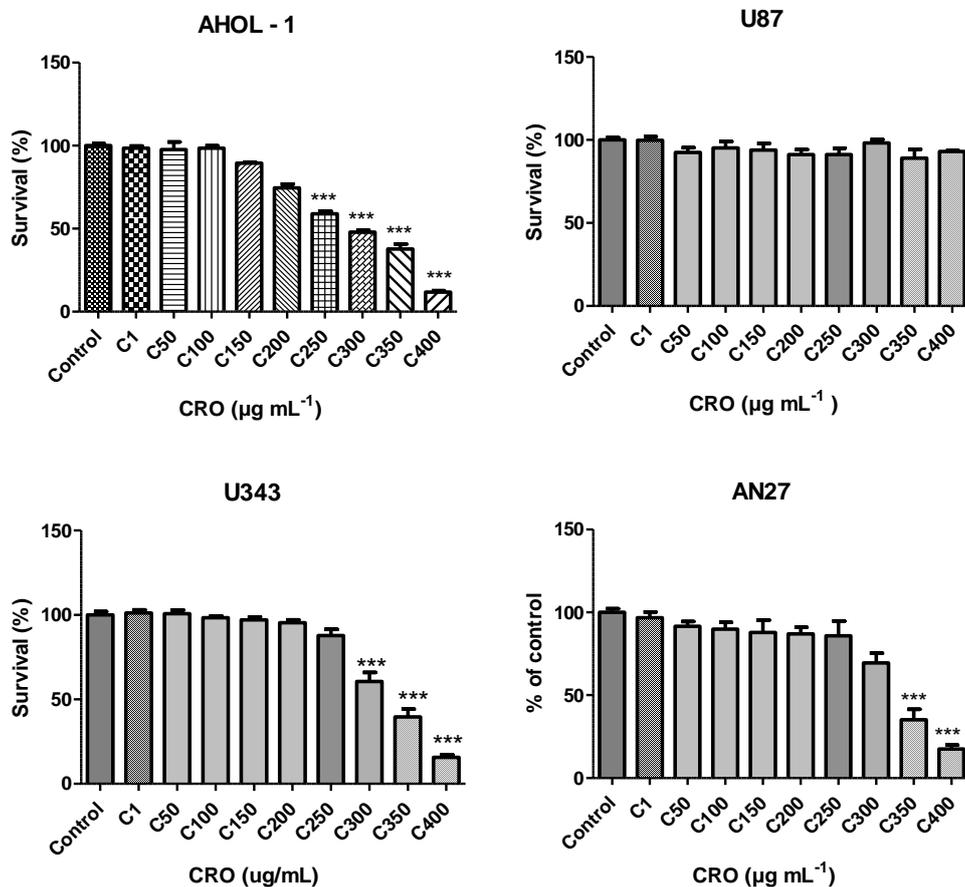
For a drug to reach and be able for treatment the glioma it has to be lipophilic and capable of reach the cells, due to its localization inside the hemato-encephalic membrane, nanoemulsions

formulations enhances the penetration ability and it is proved advantageous by the literature when analyzed with anti-inflammatory drugs (Lucca et al., 2015). The nanoemulsions achieve better penetration because associates low molecular weight and lipophilicity of the components of the oils, witch increase the availability within tumor cells (Gomes et al., 2013; Tiwari & Amiji, 2006).

The effect of treatment with CRO and the CRON were tested, with crescent concentrations (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), on cell viability of three different type of gliomas cells. After 72 hour of treatment, it was observed that both CRO and the CRON presented an effect statistically significant on the reduction on cell viability of the cells AHOL-1 and U343; however, the CRO didn't had an effect on the U87 cells at the range of concentrations tested.

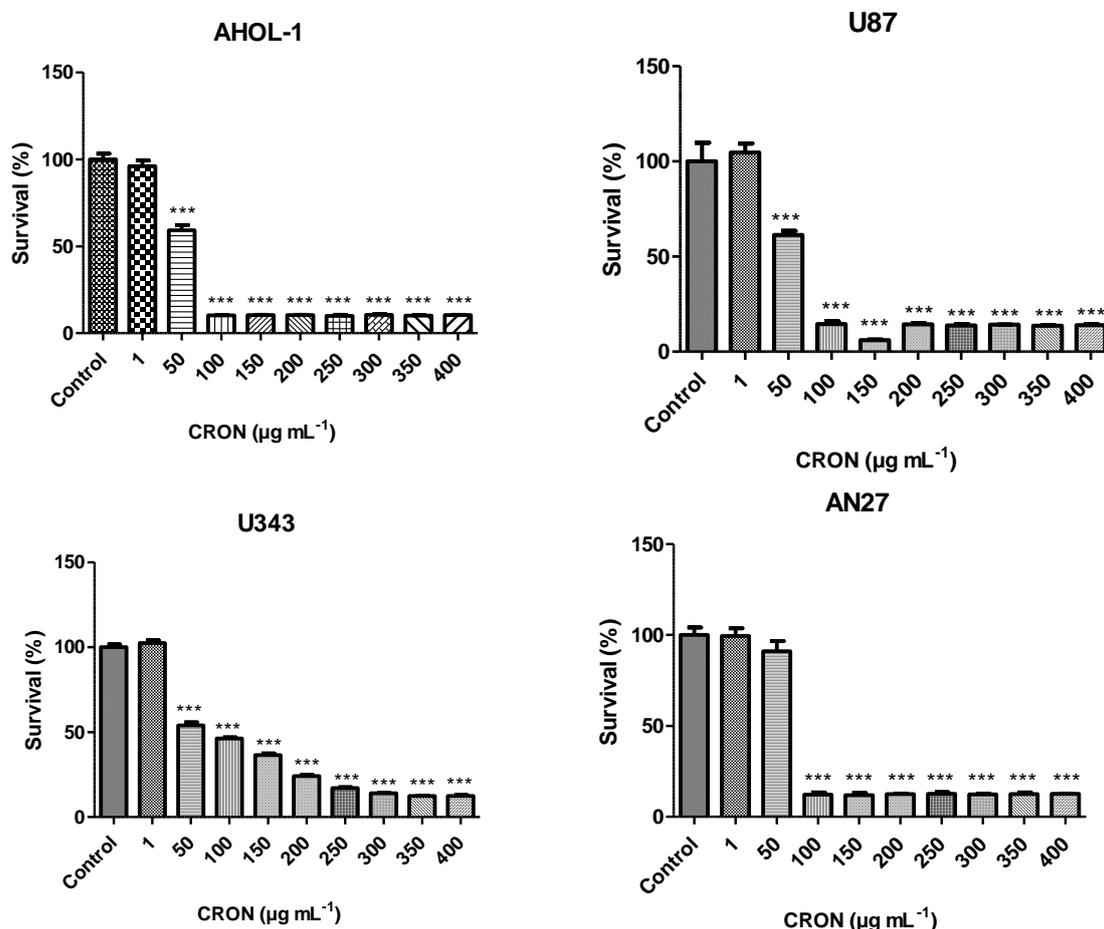
The tested cells were more resistant to the CRO, it only show significant reduction of cell viability at the higher concentrations (Figure 1). The CRO at 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ shown 12.05% of inhibition of the cells AHOL-1, but only at 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showed a significant reduction of cell viability (30.44%) compared with the control. The cell U343 had this reduction only when treated with the CRO at 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with 39.25% compared with control showing a more resistance to this treatment.

Figure 1. Effect of treatment with CR oil (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on cell viability of AHOL-1, U87, U343 and AN27 lines, after 72 h. The experiments were carried out in triplicate. Each column represents the mean \pm SD. * $p < 0.001$ for comparison versus control, as determined by ANOVA/T-student test.



The CRON, at the concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, inhibited 40.88% and 38.75% of the cell viability of AHOL-1 and U87, respectively, and at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ achieved stabilization at 90% inhibition of the cell AHOL-1 and 85% the cell U87 after 72 h of the treatment. The response of the cell U343 at this treatment was less abrupt beginning with 45.88% of inhibition at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ until stabilize at 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with 87% (Figure 2).

Figure 2. Effect of treatment with CRON (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on cell viability of AHOL-1, U87, U343 and AN27 lines, after 72 h. The experiments were carried out in triplicate. Each column represents the mean \pm SD. * $p < 0.001$ for comparison versus control, as determined by ANOVA/T-student test.



An ideal compound for the treatment of cancer is very toxic on cancer cells and has little or nothing toxicity on healthies cells, since the higher the effects on them, the most intense are the side effects. The CRON was also effective on the AN27 cells, showing at 100 $\mu\text{g/mL}$ an inhibition of 87.77% of the cells viability that extended until the higher concentration tested (400 $\mu\text{g/mL}$). However, at 50 $\mu\text{g/mL}$, although inhibit 38% to 45% of the viability at the others cells tested, it didn't had significant effect on the fibroblast cells utilized on this study as the healthy cell.

Pereira (2017) found similar results, where the cytotoxic effects of the nanoemulsions of essential oil of *Casearia sylvestris* awere more effective on A549 tumor cell line. This could be explained for the nano encapsulation of the oil can potentially alter the internalization process at the target cells in addition to the increased stability of the nanoemulsions that allow the dispersion of the non-polar coumpounds in aqueous phase (Milhomem-Paixão et al., 2017; Pereira, 2017).

However, Gomes et al (2013) obtained different results when the essential oils tested were more cytotoxic than the nanoemulsion formulations, the essential oils tested by him were rich in oxygenated sesquiterpenes, found only in 9% of the CRO, which gives to those oils a cytotoxicity based on pro-oxidant activity of compounds. Accordingly to Bakalli et al (2008) that described the cytotoxic activity of essential oils in mammalian cells is due mostly by induction of apoptosis and necrosis.

Generally, the major component of an oil is considerate the responsible for its pharmacological effects, however it is possible that a synergic effects of the several components, of the oil defying it's characteristics, as cell, penetration, lipophilic or hydrophilic attraction as well as the fixation to membranes and the cellular distribution (Bakalli et al., 2008; Cal, 2006). Following that line, the CRO is to be considerate more potent than its constituents due to its synergic effects (Gautan et al., 2014; Jun et al., 2011).

In conclusion, the results presented by this study, in the experimental conditions used in this work, the nanoemulsion were effective in reduce the cell viability of tested cells which show a possibility of its future use in the treatment of cancer. However, further studies still are needed to confirm this idea and verify the mechanisms related in this activity.

Acknowledgment

The authors thank the Instituto Evandro Chagas, the Universidade Federal do Amapá, the Universidade Federal do Oeste do Para and the Universidade Federal do Pará.

Authors' contributions

SVCH (PhD student) contributed in collecting plant sample and identification, confection of herbarium, running the laboratory work, analysis of the data and drafted the paper. RMN contributed to biological studies. MPCS contributed to biological studies. ECPO contributed in plant identification, herbarium confection and chromatographic analysis. JOCSJ and RMC contributed with the nanoemulsion characterization and critical reading of the manuscript, EHCO contributed with biological studies and critical reading of the manuscript. MRFG and DSD designed the study, supervised the laboratory work and contributed to critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

References

Adams, R.P., 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.

- Bakkhali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils: A review. *Food Chem Toxicol.* 46, 446-475.
- Bardaji, D.K.R., Da Silva, J.J.M., Bianchi, T.C., Eugenio, D.S., De Oliveira, P.F., Leandro, L.F., Rogez, H.L.G., Venezianni, R.C.S., Tavares, D.C., Bastos, J.K., Martins, C.H.G., 2016. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe.* 40, 18-27.
- Biswal, B.M., Sulaiman, S.A., Ismail, H.C., Zakaria, H., Musa, K.I., 2013. Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on the development of chemotherapy-induced fatigue and quality of life in breast cancer patients. *Integr Cancer Ther.* 12, 312-322.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., 2003. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem Toxicol.* 85, 415-421.
- Cal, K., 2006. Skin Penetration of Terpenes from Essential Oils and Topical Vehicles. *Planta Med.* 72(4), 311-316.
- Colquhoun, A. 2010. Lipids, Mitochondria and Cell Death: Implications in Neuro-oncology. *Mol Neurobiol* 42, 76–88.
- Costa, J.A.S., 2018. *Copaifera* in Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22899>
- Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Alves, A.P.N.N., Madeira, S.V.F., Pessoa, C., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O.A., 2010. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.* 2(1), 47-58.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.* 100, 72-79.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 70, 461-477.
- De Souza, G.A.G., Da Silva, N.C., De Souza, J., De Oliveira, K.R.M., Da Fonseca, A.L., Baratto, L.C., De Oliveira, E.C.P., Varotti, F.P., Moraes, W.P., 2017. In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. *Phytomedicine.* 24, 111-118.
- Dias, D.O. et al., 2014. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Anal Chim Acta.* 721, 79-84.
- Dória, G.A.A., 2015. Avaliação da atividade antitumoral da *Remirea marítima* AUBL. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal de Sergipe.
- Gautan, N., Mantha, A.K., Mittal, S., 2014. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *Biomed Res Int.* 2014, 1-23.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., 2001. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. *Farmacol.* 56, 387–389.

- Gomes, M.R.F., Schuh, R.S., Jacques, A.L.B., Augustin, O.A., Bordignon, S.A.L., Dias, D.O., Kelmann, R.G., Koester, L.S., Gehring, M.P., Morrone, F.B., Campos, M.M., Limberger, R.P., 2013. Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines in vitro. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23(2), 259-267
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841.
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M., Simjee, S.U., 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer P*. 18(1), 3–9.
- Herrero-Jauregui, C., Casado, M.A., Zoghbi, M.G.B., Martins-Da-Silva, R.C., 2011. Chemical Variability of *Copaifera reticulata* Ducke Oleoresin. *Chem Biodivers* 8,674- 685.
- Hosseini, A., Ghorbani, A., 2015. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 5(2), 84-97.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva –INCA. 2015 Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA.
- Izquierdo, P., Feng, J., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, J.C., Garcia, M.J., Azemar, N., Solans, C., 2005. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *J Colloid Interf Sci*. 285, 388-394.
- Johansen, E., Grassi, E.S., Pantazopoulou, V., Tong, B., Lindgren, D., Berg, T.J., Pietras, E.J., Pietras, H.A., 2016. CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Reports*. 20, 1641–1653.
- Jun, N.J., Mosaddik, A., Moon, J.Y., Jang, K., Lee, S., Ahn, K.S., Cho, S.K., 2011. Cytotoxic Activity of β -Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. *Rec Nat Prod*. 5(3), 242-246
- Lima, S.R.M., Veiga Junior, V.F., Christo, H.B., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2003. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. *Phytother. Res*. 17, 1048–1053.
- Lucca, G.C., de Matos, S.P., Borille, B.T., Dias, D.O., Teixeira, H. F., Veiga Junior, V. F., Limberger, R.P., Koester, L.s., 2015. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaíba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *J Pharmaceut Biomed*. 104, 144-148.
- Milhomem-Paixão, S.S.R., Fascineli, M.L., Muehlmann, L.A., Melo, K.M., Salgado, H.L.C., Joanitti, G.A., Pieczarka, J.C., Azevedo, R.B., Santos, A.S., Grisolia, C.K., 2017. Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet) Nanoemulsions: Development and Assessment of Cytotoxicity, Genotoxicity, and Hematotoxicity. *J Nanomater*. 2017, 1-11.
- Mortazavian, S.M., Ghorbani, A., Hesari, T.G., 2012. Effect of hydro-alcoholic extract of *Viola tricolor* and its fractions on proliferation of uterine cervix carcinoma cells. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*. 15, 9–16.
- Pereira, F.G., Marquete, R., Oliveira-Cruz, L., Quintanilha-Falcão, D., Mansur, E., Moreira, D.L., 2017. Cytotoxic effects of the essential oil from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) and its nanoemulsion on A549 tumor cell line. *B Latinoam Caribe Pl*. 16(5), 506 – 512.

- Sachetti, C.G., Fascineli, M.L., Sampaio, J.A., Lameira, O.A., Caldas, E.D, 2011. Assessment of the neurotoxic potential and acute toxicity of copaiba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 19(4), 937-941.
- Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Ozer, H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 15, 549–554.
- Shimizu, M., Shogana, H., Matsuzama, S., 1990. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs IV constituents and anti-inflammatory effect of paraguayian crude 'Alhucema' (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chem Pharm Bull.* 38, 2283–2291.
- Sultana, S., Asif, H.M., Nazar, H.M.I., Akhtar, N., Rehman, J.U., Rehman, R.U., 2014. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. *Asian Pac J Cancer P.* 15, 4385-4394.
- Tanaka, T., Shimizu, M., Kochi, T., Moriwaki, H., 2013. Chemichal-induced Carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine.* 5, 203-209. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878331713001277>.
- Tang, W., Chan, E., Kwok, C., Lee, Y., Wu, J., Wan, C., Chan, R.Y., Yu, P.H., Chan, S., 2012. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology.* 20, 307-314.
- Tincusi, B.M., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Moujir, L.M., Mamani, Z.A., Barroso, J.P., Ravelo, A.G., Hernández, B.V., 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Planta Med.* 68, 808-812.
- Tiwari SB, Amiji MM 2006. Nanoemulsions formulations for tumor-targeted delivery, nanotechnology for cancer therapy. United States: Mansoor M. Amiji, Taylor and Francis Group.
- Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. *J Ethnopharmacol* 112:248–254
- Watkins, S., Robel, S., Kimbrough, I.F., Robert, S.M., Ellis-Davies, G., Sontheimer, G., 2014. Disruption of astrocyte–vascular coupling and the blood–brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun.* 5:4196
- WHO. Cancer. Fact Sheet No. 2971. geneva, switzerland: World health organization; 2014. <http://www.who.int>.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados por este estudo, nas condições experimentais utilizadas mostraram que a nanoemulsão foi eficaz em reduzir a viabilidade celular das células testadas, o que mostra uma possibilidade de seu uso futuro no tratamento do câncer. No entanto, mais estudos ainda são necessários para confirmar essa ideia e verificar quais os mecanismos relacionados a essa atividade.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C. L. Câncer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: na introduction. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- BISWAL, B. M.; SULAIMAN, S. A.; ISMAIL, H. C.; ZAKARIA, H.; MUSA, K.I. Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on the development of chemotherapy-induced fatigue and quality of life in breast cancer patients. **Integr Cancer Ther**, v. 12, p. 312-22, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade (SIM)**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>. Acessado em: 20 fev. 2015.
- CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytother Res**, v. 19, p. 946-950, 2005.
- CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNGA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, p. 388-392, 2006.
- COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, p. 72-79, 2005.
- DÓRIA, Grace Anne Azevedo. **Avaliação da atividade antitumoral da *Remirea marítima* AUBL**. Tese (Pós Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2015.
- GURGAN, T.; SALMAN, C.; DEMIROL, A. Pregnancy and assisted reproduction techniques in men and women after cancer treatment. **Placenta**, v. 29, S.B, p. 152–159, 2008.
- HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S.M., Simjee, S.U., Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. **Asian Pac J Cancer P.**, v.8, n.1, p. 3–9, 2017.

HERRERO-JAUREGUI , C.; CASADO, M. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DASILVA, R. C. Chemical Variability of *Copaifera reticulata* Ducke Oleoresin. **Chem Biodivers** , v. 8, p. 674- 685, 2011.

HOSSEINI, A.; GHORBANI, A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna J Phytomed**, v. 5, n. 2, p. 84-97 2015

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro : Inca, 2002.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva –INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2015.

KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Res Int**, v. 51, p. 467-473, 2013.

MORTAZAVIAN, S.MI.; GHORBANI, A. Antiproliferative effect of viola tricolor on neuroblastoma cells in vitro. **Aust J Herb Med**. v. 24, p. 93-96, 2012.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of câncer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, v. 269, p. 378-387, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod**. v. 70, p. 461-477, 2007.

NØRØXE, D. S.; POULSEN, H. S.; LASSEN, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. **ESMO Open**, v. 1, n. 6:e000144, 2017.

ONG, Z. Y.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; DARBY, J. M.; LOGAN, R. M.; YEOH, A. S.; KEEFE, D. M. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy induced gastrointestinal mucositis. **Radiat Oncol**, v. 2010, p. 5:22, 2010.

Organização Mundial de Saúde. **World Cancer Report 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acessado em: 16, fev. 2015.

RASHID, H.; GAFUR, G. M.; SADIK, R. M. Biological activities of a new derivative from Ipomoea turpithum. **Pakistan J Biol Sci**, v. 5, p. 968-9, 2002.

RIBEIRO, Juliana Carvalho. Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo*. Tese (Pós Graduação em Toxicologia) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

- ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015
- ROMERO, A. B. R.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; FERREIRA, N. R. T.; BRITO, A. K. S.; DA CUNHA, P. F. M.; DE LIMA, A.; DE ASSIS, R. C.; ARAUJO, E. M. In vitro and in vivo antioxidant activity of Buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.). **Nutr Hosp.** V. 32, n. 5, p. 2153-2161, 2015.
- SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n.4, p. 937-941, 2011
- SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; ANDRADE, B. F. M. T.; DA SILVA, J. J. M.; RODEZ, H. L. G.; CREVELIN, E. J.; DE MORAES, L. A. B.; VENEZIANI, R.; AMBROSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomed Pharmacother**, v. 70, p. 12-18, 2015.
- SHARMA, H.; PARIHAR, L.; PARIHAR, P. Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. **J Med Plant Res** v. 5, n. 10, p. 1818-1835, 2011.
- SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bang J Pharmacol**, v. 1, p. 35-41, 2006.
- SULLIVAN, R.; ALATISE, O. I.; ANDERSON, B. O.; AUDISIO, R.; AUTIER, P.. et al. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. **Lancet Oncol**, v. 16, p. 1193–1224, 2015
- SULTANA, S.; ASIF, H. M.; NAZAR, H. M. I.; AKHTAR, N.; REHMAN, J. U.; REHMAN, R. U. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. **Asian Pac J Cancer P**, v. 15, p. 4385-4394, 2014.
- TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, p. 203-209, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878331713001277>. Acessado em: 10 mar. 2015.
- TANG, W.; CHAN, E.; KWOK, C.; LEE, Y; WU, J.; WAN, C.; CHAN, R. Y.; YU, P. H.; CHAN, S. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. **Inflammopharmacol**, v. 20, p. 307-314, 2012.
- TANNOCK, I. F.; AHLES, T. A.; GANZ, P. A.; VAN DAM, F. S. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. **J Clin Oncol**, v. 22, p. 2233–2239, 2004.
- TINCUSI, B. M.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNÁNDEZ, B. V. Antimicrobial terpenoids from

the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Med**, v. 68, p. 808-812, 2002.

TRINDADE, V.; PICARELLI, H.; FIGUEIREDO, E. G.; TEIXEIRA, M. J. Gliomas: marcadores tumorais e prognósticos. **Arq Bras Neurocir**, v. 31, n. 2, p. 91-94, 2012.

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

WRENSCH, M.; MINN, Y.; CHEW, T.; BONDY, M.; BERGER, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-Oncol**, v. 4, p. 278-99, 2002.