

Avaliação da atividade antiproliferativa da oleorresina de *Copaifera reticulata* em células de leucemia promielocítica aguda

Daniele de Sá Pereira; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil; Danieledesapereira@gmail.com

Regiane Costa de Oliveira; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

Juniel Assis Crespo Neto; Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brasil

Josiane Elizabeth Almeida-Silva; Departamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

Fabiola Eloise Rodrigues Dias; Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA, Brazil;

Elaine Cristina Pacheco de Oliveira; Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA, Brazil;

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

Allyson Guimarães da Costa; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

1. Introdução

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é uma forma rara e agressiva de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), caracterizada pelo rearranjo do gene PML-RARA, que bloqueia a diferenciação dos promielócitos e leva ao acúmulo de células imaturas na medula óssea e na circulação periférica. Apesar dos avanços terapêuticos, como o uso do ácido all-trans retinoico (ATRA) e do trióxido de arsênio (ATO), a resistência ao tratamento, os efeitos adversos e a ocorrência de recaídas continuam sendo desafios clínicos importantes¹.

Diante desse cenário, a busca por novas estratégias terapêuticas é fundamental. A oleorresina de *Copaifera reticulata* (Fabaceae), tradicionalmente utilizada na medicina popular amazônica, tem demonstrado propriedades antioxidantes, curativas, estimulantes da formação óssea, citotóxicas, gastroprotetoras, antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, anthelmínticas e antisépticas¹⁻³. A oleorresina é composta por duas frações principais: a fração resinosa, rica em diterpenos como o ácido copálico e o ácido kaurênico, associados à modulação do ciclo celular, efeitos anti-inflamatórios e atividades citotóxicas⁴ e a fração volátil, também chamada de óleo essencial, predominantemente composta por sesquiterpenos, como o β -cariofileno, com ação antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora^{5,6}. Estudos com diferentes espécies de *Copaifera* demonstram que a composição química da oleorresina varia entre espécies e regiões, refletindo-se em diferentes perfis de atividade biológica. Atividades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas têm sido observadas em várias oleorresinas, reforçando seu potencial terapêutico.⁷

A linhagem HL60, derivada de um paciente com LPA, é amplamente utilizada como modelo experimental para avaliação de compostos com potencial antiproliferativo, pró-apoptótico e indutor de diferenciação em células leucêmicas. Avaliar a oleorresina de *Copaifera reticulata*, frente à HL60, permite investigar seu potencial terapêutico em células tumorais específicas. Além disso, a utilização de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) e células VERO (epitélio renal de macaco) como controles não tumorais possibilita avaliar a seletividade do efeito, fornecendo informações importantes sobre segurança celular. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da oleorresina de *Copaifera reticulata* em células de leucemia promielocítica aguda.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos:

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica”, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com o seguinte número de Parecer: 4.982.395.

2.2 Modelo de estudo:

Trata-se de um estudo analítico experimental, do tipo pré-clínico (fase 1).

2.3 Obtenção do óleo resina de *Copaifera reticulata*

A oleorresina de *Copaifera reticulata* foi adquirida em parceria com a Universidade Federal do Oeste (UFOPA), Santarém, PA, Brazil, juntamente com sua caracterização físico-química.

2.4 Cultura de células:

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram a HL-60 (leucemia promielocítica aguda; ATCC CCL-240) e VERO (epitélio renal de macaco; ATCC CCL-81). As células HL-60 de crescimento em suspensão foram cultivadas em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol, modificado com L-glutamina, HEPES e bicarbonato de sódio (Gibco, Rockville, MD) e as células VERO, de crescimento aderente foram cultivadas em meio DMEM (alta glicose) e L-glutamina, ambos meios suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e quantidades apropriadas de antifúngico e antibiótico, mantidos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

2.4 População do estudo e isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC):

Foram incluídos no estudo indivíduos saudáveis que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e aceitaram participar da pesquisa. O sangue periférico foi coletado com anticoagulante EDTA. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade com Histopaque-1077 (Sigma), lavadas três vezes em meio RPMI e, em seguida, cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^5 células/poço. Posteriormente, as células foram submetidas aos tratamentos experimentais para avaliação da citotoxicidade em células saudáveis não imortalizadas.

2.5 Ensaio de viabilidade celular:

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, adaptado de Alves et al. (2023). Linhagens HL-60, VERO e PBMC foram cultivadas (5×10^5 células/poço) em placas de 96 poços, tratadas com diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5, 6 e 3 µg/mL) do composto (triplicata) e incubadas por 24, 48 e 72h a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) + 100 µL de meio RPMI sem vermelho de fenol e incubado por 4 h a 37 °C. A reação será interrompida com 100 µL DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância medida a 570 nm. A proliferação relativa será calculada como: $(A_{570} \text{ tratada} / A_{570} \text{ controle}) \times 100$.

2.6 Análise estatística:

As análises dos dados foram realizadas no GraphPad Prism (v.8.0). As variáveis numéricas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo), caso não apresentem distribuição normal e variáveis categóricas como valores absolutos (n) e frequência relativa (%). Para variáveis categóricas utilizamos o Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A citotoxicidade relativa da substância foi avaliada por teste t de Student, Mann-Whitney ou ANOVA.

3. Resultados e Discussão:

3.1 Efeito do óleo resina de *Copaifera reticulata* na viabilidade celular (MTT)

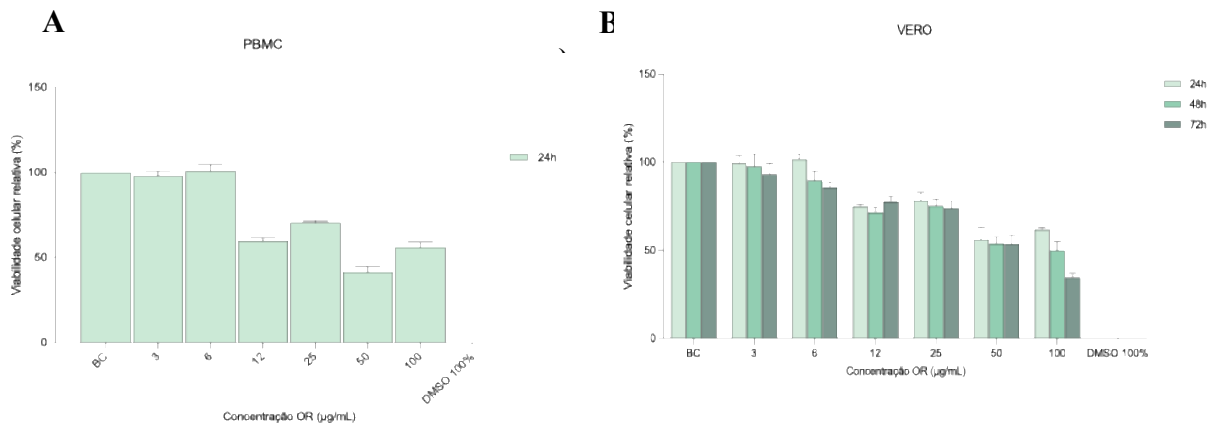


Figura 1. Perfil da viabilidade celular após o tratamento com o oleorresina de *Copaifera reticulata* (OR). (A) Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis; (B) células VERO.

Os resultados demonstram que o tratamento com a oleorresina de *Copaifera reticulata* durante o período de 24, 48 e 72 horas não promoveu alterações expressivas na viabilidade das PBMC (**Figura 1 - parte A**) e da linhagem VERO (**Figura 1 - parte B**), mesmo em concentrações elevadas. Sugerindo um perfil de baixa toxicidade em células normais e reforçando o papel de seletividade do composto. Estudos anteriores como o de Caetano-Frota et al. (2023) corroboram esses achados, indicando que diterpenos majoritários, como o ácido copálico e o ácido caurenóico, apresentam maior afinidade por células tumorais, desencadeando apoptose e alterações do ciclo celular sem comprometer significativamente células saudáveis⁸. Esse comportamento é relevante, pois um dos principais desafios no desenvolvimento de terapias antineoplásicas é manter a viabilidade de células normais e reduzir os efeitos adversos.

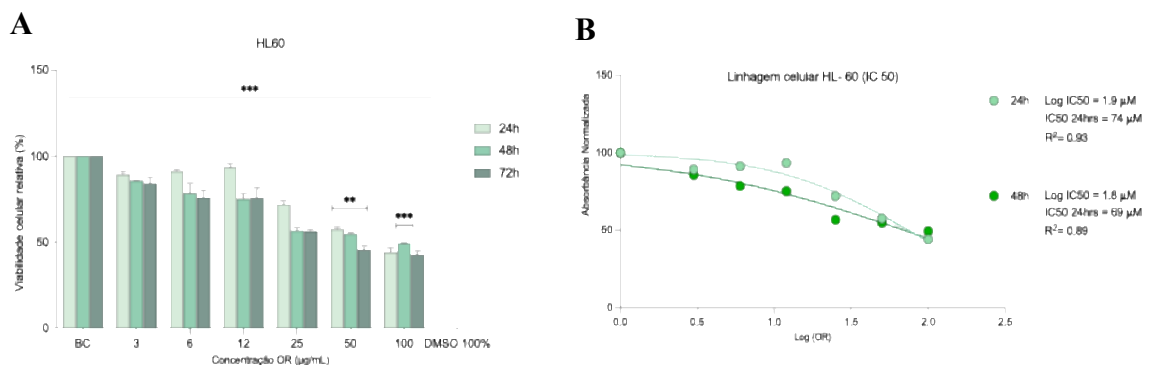


Figura 2. Perfil da viabilidade celular após o tratamento com o oleorresina de *Copaifera reticulata* (OR) em células HL60 (leucemia promielocítica aguda). (A) citotoxicidade HL-60 VS óleorresina, (B) IC50 da linhagem HL60.

Em contrapartida, foi possível observar um efeito citotóxico significativo da oleorresina frente à linhagem HL-60, com redução da viabilidade celular em concentrações a partir de 50 µg/mL. O efeito foi tempo e dose-dependente, alcançando IC₅₀ de 74 µM. Após 24h, houve uma redução significativa da viabilidade em 50 µg/mL ($p < 0,005$) e após 48h na concentração de 100 µg/mL ($p < 0,001$), o que evidencia um potencial antiproliferativo robusto (Figura 2). A faixa de concentração do IC 50 e os resultados demonstrados acima, estão de acordo com dados encontrados na literatura os quais demonstraram a ação de diterpenos da *Copaifera* na indução de apoptose e parada do ciclo celular em diferentes tipos de câncer como em Almeida et al., (2023) e S.Vargas et al. (2015) 9,10. Além disso, há evidências de que tais compostos também modulam a resposta imunológica, o que pode contribuir para limitar a progressão tumoral. A oleorresina demonstrou ação inibitória significativa na produção de IL-10 e um perfil ativador nos monócitos humanos sem afetar a viabilidade celular¹¹ e ação anti-inflamatória com efeito na reparação tecidual¹². Assim, os achados do presente estudo reforçam o potencial da oleorresina como agente antineoplásico, com efeito citotóxico mais acentuado em células leucêmicas e segurança frente a células normais, evidenciado nos diferentes tempos de exposição analisados.

4. Conclusões

A oleorresina de *Copaifera reticulata* demonstrou uma atividade citotóxica seletiva frente à linhagem leucêmica HL-60, promovendo redução significativa da viabilidade celular de forma tempo e concentração-dependente (24, 48 e 72h), enquanto manteve baixa toxicidade sobre células não tumorais (PBMC e VERO). Esses resultados sugerem que a oleorresina contém compostos bioativos com potencial antineoplásico, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Portanto, os achados reforçam a relevância de produtos naturais amazônicos como fontes estratégicas na busca por alternativas terapêuticas contra leucemias, ao mesmo tempo em que evidenciam a necessidade de estudos adicionais e análises moleculares mais aprofundadas para melhor elucidar e caracterizar os efeitos biológicos da oleorresina, bem como confirmar sua segurança e aplicabilidade clínica.

Palavras-Chave: Leucemia, citotoxicidade, oleorresina, antineoplásicos, *Copaifera reticulata*

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação HEMOAM e à FAPEAM pela disponibilização de recursos financeiros, ao CNPq pelo apoio institucional, a Universidade Federal do Oeste do Pará pela colaboração e disponibilização do produto testado, e ao grupo de pesquisa Amazon InterScience pelo suporte durante este estudo.

Divulgação

Os autores não relataram qualquer conflito de interesse durante a condução deste estudo. Portanto, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais e possui a aprovação e permissão dos autores para a divulgação deste resumo por meios eletrônicos.

5. Referências

1. Caetano Frota JK, Franchi Junior GC, Sartoratto A, Silva MC, de Andrade Picanço T, E Silva JEA, et al. Chemical evaluation and in vitro cytotoxic activity of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in cancer cell lines. ACTA Paulista de Enfermagem. 2025;55.
2. Ames-Sibin AP, Barizão CL, Castro-Ghizoni C V., Silva FMS, Sá-Nakanishi AB, Bracht L, et al. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces

systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *J Cell Biochem.* 2018 Dec 1;119(12):10262–77.

3. Menezes AC dos S, Alves LDB, Goldemberg DC, de Melo AC, Antunes HS. Anti-inflammatory and wound healing effect of Copaiba oleoresin on the oral cavity: A systematic review. *Heliyon.* 2022 Feb;8(2):e08993.

4. Pfeifer Barbosa AL, Wenzel-Storjohann A, Barbosa JD, Zidorn C, Peifer C, Tasdemir D, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. *J Ethnopharmacol.* 2019 Apr 6;233:94–100.

5. Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2011;13(1):1–7.

6. Pfeifer Barbosa AL, Wenzel-Storjohann A, Barbosa JD, Zidorn C, Peifer C, Tasdemir D, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. *J Ethnopharmacol.* 2019 Apr;233:94–100.

7. Souza G de, Teixeira CP, Lima Júnior JP de, Almeida MPO, Paschoalino M, Luz LC, et al. *Trypanosoma cruzi* Growth Is Impaired by Oleoresin and Leaf Hydroalcoholic Extract from *Copaifera multijuga* in Human Trophoblast and Placental Explants. *Pathogens.* 2025 Jul 25;14(8):736.

8. FROTA JKC, FRANCHI JUNIOR GC, SARTORATTO A, SILVA MC, PIKANÇO T de A, SILVA JEA e, et al. Chemical evaluation and in vitro cytotoxic activity of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in cancer cell lines. *Acta Amazon.* 2025;55.

9. Almeida JE, de Oliveira AC, de Castro Alves CE, Filho SMC, de Oliveira ECP, Zuliani JP, et al. Diterpenes: Nature's Hidden Gems of Immunomodulation. *Int J Mol Sci.* 2025 Mar 3;26(5):2250.

10. De S. Vargas F, D. O. de Almeida P, Aranha E, De A. Boleti A, Newton P, De Vasconcellos M, et al. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. *Molecules.* 2015 Apr 9;20(4):6194–210.

11. Santiago KB, Conti BJ, Murbach Teles Andrade BF, Mangabeira da Silva JJ, Rogez HLG, Crevelin EJ, et al. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2015 Mar;70:12–8.

12. Alvarenga MOP, Bittencourt LO, Mendes PFS, Ribeiro JT, Lameira OA, Monteiro MC, et al. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int J Mol Sci.* 2020 May 18;21(10):3568.