

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE FRAÇÕES ORGÂNICAS
E EXTRATO BRUTO DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* DESF.
(CAESALPINIACEAE)**

Carolina Ribeiro e Silva^{*}
Regildo Márcio Gonçalves Silva^{**}

Resumo: A *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) é uma espécie arbórea, nativa do cerrado, decídua ou semidecídua, que perde suas folhas quase que completamente nos meses de junho a setembro e que possui casca vermelho escuro com profundas fendas longitudinais e avermelhadas interiormente. As folhas, cascas e o óleo desta planta são empregados para as mais variadas doenças na medicina folclórica do Alto Paranaíba. Este trabalho teve por objetivo investigar a possível ação antitumoral de extratos de folha de *C. langsdorffii* por meio da inibição da indução de calos promovidos por *Agrobacterium tumefaciens*. Para tanto, 7 placas de Petri (3 repetições cada) contendo meio de ágar recebeu 5 discos de *Solanum tuberosum*, foram divididas em grupos controles e experimentais. Os controles negativos receberam somente extrato bruto (EB100) e água destilada (CNA) e o positivo recebeu somente *A. tumefaciens*. Os grupos experimentais foram incubados com diferentes concentrações em porcentagem do extrato bruto de folha de *C. langsdorffii* (EB100, EB10, EB01 e EB0,1). O extrato de *C. langsdorffii* empregado nas diferentes concentrações foi capaz de inibir significativamente a formação de calos provocados por *A. tumefaciens* (EB100 – 60%, EB10 – 78%, EB01 – 72% e EB0,1 – 81% de inibição de calos). Os resultados obtidos sugerem que, nestas condições experimentais, o extrato de folha de *C. langsdorffii* possui substâncias com ação antitumoral, por controlar e inibir a proliferação celular promovida pela *A. tumefaciens*.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*. *Agrobacterium tumefaciens*. Ação antitumoral.

Abstract: The *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) is an arboreal species, native of the savannah, deciduous or semideciduous, that loses their leaves almost that completely the months of June to September, it possesses peel dark red with deep longitudinal rifts and reddened inwardly. The leaves, peels and the oil of this plant are used for the most varied diseases in the folkloric medicine of Alto Paranaíba. This work had for objective to investigate the possible action antitumoral of extracts of leaf of *C. langsdorffii* through the inhibition of the induction of calluses promoted by *Agrobacterium tumefaciens*. For so much, 7 plates of Petri (3 repetitions each) containing middle of ágar received 5 disks of *Solanum tuberosum*, they were divided in groups controls and experimental. The negative controls received only rude extract (EB100) and distilled water (CNA) and the positive received only *A. tumefaciens*. The experimental groups were incubated with different concentrations in percentage of the rude extract of leaf of *C. langsdorffii* (EB100, EB10, EB01 and EB0,1). THE extract of *C. langsdorffii* used in the different concentrations were capable to inhibit the formation of calluses significantly provoked by *A. tumefaciens* (EB100 - 60%, EB10 - 78%, EB01 - 72% and EB0,1 - 81% of inhibition of calluses). The obtained results suggest that in these experimental conditions the extract of leaf of *C. langsdorffii* possesses substances with action antitumoral, for to control and to inhibit the cellular proliferation promoted by the *A. tumefaciens*.

^{*} Graduada em Ciências Biológicas pelo UNIPAM e bolsista do IV PIBIC.

^{**} Professor adjunto do Centro Universitário de Patos de Minas e orientador da pesquisa.

Key-words: *Copaifera langsdorffii*. *Agrobacterium tumefaciens*. Action antitumoral.

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa a segunda causa de morte no Brasil, sendo ultrapassado apenas pelas doenças cardiovasculares. Nas regiões economicamente mais desenvolvidas (Sudeste e Sul), a morte por câncer é mais freqüente que nas regiões subdesenvolvidas (BEVILACQUA *et al.*, 1998).

Inúmeros agentes têm sido e continuam sendo reconhecidos como cancerígenos, atingindo cifras superiores a 1500 agentes. Tais agentes agem provocando mutações genéticas intracelulares (alteração do genoma), as quais, por outro lado, são controladas e anuladas pelo sistema de vigilância imunológica do organismo. Quando este sistema não é capaz de inibir a freqüência de mutações produzidas por um agente cancerígeno, o aumento da proporção de células mutantes dá origem a uma população de células cancerosas que se multiplica exponencial e descontroladamente (BEVILACQUA *et al.*, 1998).

Embora a causa da maioria dos tumores malignos permaneça desconhecida, recentes pesquisas demonstraram mutações nas seqüências do DNA, levando à expressão anormal ou desregulada de proto-oncogenes ou deleção de "genes supressores tumorais", ou a ambos os processos, que têm sido relacionados à proliferação celular anormal. Tais mutações podem ser devidas à exposição ambiental, à suscetibilidade genética, a agentes infecciosos, e a outros fatores. Observa-se que a maioria dos tumores exibe anormalidades cromossômicas como deleções, inversões, translocações, ou duplicações (TIERNEY JÚNIOR *et al.*, 2001).

Tendo em vista o seu potencial proliferativo, as células animais e vegetais, quando estão expostas aos mesmos agentes carcinogênicos, também sofrem modificações, mutações e/ou recombinações genômicas podendo levar à formação de tumores em tecidos vegetais.

A galha em coroa, ou galha do colo, é uma doença causada pela *Agrobacterium tumefaciens* (SILVA, 2002). Esta bactéria transfere para as células vegetais uma porção de DNA, em cadeia simples e protegida por proteínas bacterianas, que se integra no núcleo da célula vegetal, restaurando a dupla cadeia, causando crescimento de um tumor.

Isso se deve à produção de hormônios pelo tecido infectado e à síntese de compostos dos quais a bactéria se alimenta (OLIVEIRA, 2002).

A infecção por *A. tumefaciens* ocorre pela penetração ativa através de injúrias do tecido vegetal (OLIVEIRA, 2002), dando início à formação e à proliferação do tumor vegetal (SILVA, 2002).

A patogenicidade e o mecanismo básico da tumorigênese da *A. tumefaciens* envolvem a transferência de moléculas específicas do T-DNA (DNA de transferência), o plasmídeo indutor de tumor (*Ti*), para as células da planta. Para que essa transferência ocorra com sucesso, diversos fatores devem atuar conjuntamente. Entre eles, talvez os genes da região *vir* plasmídeo *Ti* estejam entre os mais imprescindíveis. Os genes *vir* codificam a maioria das proteínas necessárias à transferência do T-DNA para as células da planta, que têm integrado ao seu genoma este segmento de DNA (SILVA, 2002).

Uma vez integradas ao genoma da planta, as células infectadas se tornam transformadas. É desencadeada, então, uma série de mudanças na planta e as células começam a se multiplicar desorganizadamente. Muitos pesquisadores relatam que acontece um distúrbio hormonal (auxinas e citocininas), o que contribui para esta proliferação celular (SILVA, 2002).

As moléculas indutoras são requeridas para desencadear todo esse processo. Normalmente, elas são secretadas através dos ferimentos e das raízes das plantas, que atraem a bactéria e induzem os genes da região *vir* do T-DNA. Dentre os glicídeos e os aminoácidos, o mais forte quimioatrativo é a sacarose (SILVA, 2002).

No Brasil, somente 20% da população consomem 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto que o restante encontra nos medicamentos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico. Até o momento, ainda não se conhece quase nada sobre a composição química de 99,6% das plantas de nossa flora, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies (STANGARLIN et al., 2002).

Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada, ainda não teve estudadas as suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, entre outras. Quando esses compostos são extraídos das plantas por processos específicos, como a destilação por arraste de vapor de água, dão origem a líquidos de consistência semelhantes aos óleos

essenciais. Compostos secundários de plantas medicinais estão distribuídos em um grande número de famílias botânicas, com muitos deles apresentando atividade antimicrobiana, como é o caso dos alcalóides, com origem biossintética a partir da via metabólica do ácido shiquímico (STANGARLIN et al., 2002).

A espécie *Copaifera langsdorffii* pertence à família Leguminosae Juss, sub-família Caesalpinoideae Kunth, seguindo a classificação de Cronquist; o gênero *Copaifera* L. pertence à família Caesalpiniaceae R. Br. No Brasil, a espécie *C. langsdorffii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída por todo o território (da Amazônia a Santa Catarina, no Nordeste e Centro-Oeste) (VEIGA JR e PINTO, 2002). É uma espécie arbórea emergente com ampla distribuição, ocorrendo nas matas de galeria, nas matas mesofíticas de afloramento calcáreo, nos cerrados e nos cerradões do Brasil central. *C. langsdorffii* é conhecida vulgarmente por copaíba, pau-d'óleo, bálsamo e óleo-de-pau (SALGADO et al., 2001).

As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançando de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos (VEIGA JR e PINTO, 2002). No Distrito Federal, a *C. langsdorffii* atinge alturas superiores a 20m (SALGADO et al., 2001).

As copaíbas possuem tronco áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um óvulo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (VEIGA JR e PINTO, 2002).

A floração e frutificação das copaíbas ocorre entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro, com variações dentro destes intervalos, dependendo da região. *C. langsdorffii* é nectífera e polinizada no período diurno, de 8:00 às 16:00 horas, com grande participação de *Trigona* sp. e *Apis mellifera*, pois foram encontrados grãos de pólen em amostras de mel do estado do Ceará. O óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (VEIGA JR e PINTO, 2002).

O óleo de copaíba é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Para a utilização farmacológica, são preferidos os óleos mais escuros e viscosos. Somente na espécie *C. langsdorffii*, o óleo de copaíba possui coloração vermelha, semelhante ao sangue de dragão (*Croton* sp), recebendo a denominação popular de copaíba vermelha (VEIGA JR e PINTO, 2002).

As propriedades medicinais desse óleo já eram conhecidas pelos índios que o usavam principalmente como cicatrizante e antiinflamatório. Dessa forma, a copaíba foi uma das primeiras espécies a serem descritas pelos cronistas portugueses. A primeira citação sobre o óleo talvez tenha sido em uma carta de Petrus Martius ao Papa Leão X, publicada em Estrasburgo em 1534, em que a droga utilizada pelos índios era chamada de "Copei" (VEIGA JR e PINTO, 2002).

Nos últimos anos, o retorno da terapêutica natural trouxe de volta os fitoterápicos para as farmácias de todo o país, mas os conhecimentos da utilização da *C. langsdorffii* se perderam, ou aparecem bastante confusos nas centenas de publicações que não apresentam mais que duas ou três propriedades farmacológicas já bastante conhecidas (VEIGA JR. e PINTO, 2002).

O chá das cascas e sementes da *Copaifera* é indicado para diversos males, especialmente na Venezuela e Colômbia, onde são utilizados como antihemorroidal e purgativo e na Amazônia Brasileira é indicado no tratamento de moléstias pulmonares e asma (VEIGA JR e PINTO, 2002).

A atividade antitumoral de óleos de *Copaifera langsdorffii* foi observada contra carcinoma IMC, em camundongos. O fracionamento guiado por bioensaio mostrou que os diterpenos colavenos (D11) e o ácido hardwíckico (D8) apresentam potente atividade antitumoral, sem, contudo, apresentarem citotoxicidade contra as mesmas células (VEIGA JR e PINTO, 2002).

Vários dos compostos já isolados ou detectados nos óleos de copaíba já tiveram propriedades farmacológicas descritas na literatura. Entre os sesquiterpenos, alguns apresentam propriedades como antiúlcera, antiviral e antirrinovírus, que são descritas para o ar curcumeno e B-bisaboleno, este último também descrito como abortivo. O bisabolol é conhecido por conferir as propriedades antiinflamatória e analgésica à camomila, *Matricaria chamomilla*, o β -elemeno é descrito como anticâncer (cérvico) e cariofileno e δ -cadineno como anticariogênicos, sendo este último também bactericida (CMI 800ug/ml) (VEIGA JR e PINTO, 2002).

Entre estes, entretanto, os que foram mais estudados e se mostraram ativos num maior número de ensaios foram o cariofileno e seu óxido. O cariofileno é descrito na literatura como anti-edêmico, antiinflamatório (CI₅₀=100uM), fagorrepelente, antitumoral, bactericida, insetífugo e antialérgico. Algumas destas atividades são também conferidas ao óxido, além de inseticida (VEIGA JR e PINTO, 2002).

Poucos são os artigos onde é encontrada a identificação botânica da espécie estudada, apesar da extensa literatura que trata dos óleos de copaíba. Os estudos de atividade biológica confirmam a sabedoria popular e o conhecimento adquirido dos índios pelos portugueses já no início da colonização. Poucos deles, porém, conseguem identificar os princípios ativos, apesar de sugerirem que compostos fortemente ativos estão presentes. Contudo, apesar de toda a pesquisa já realizada, os órgãos vegetais e os óleos de copaíba são potencialmente importantes como fonte de princípios ativos (VEIGA JR e PINTO, 2002).

O tema do trabalho é “Avaliação do potencial antitumoral de frações orgânicas e extrato bruto de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae)”. Tendo por objetivo investigar a atividade antitumoral de extratos brutos e frações orgânicas isoladas de *Copaifera langsdorffii* Desf., utilizou o teste de inibição da indução de calos em *Solanum tuberosum* (batata) promovido por *Agrobacterium tumefaciens*. Devido ao aumento dos casos de câncer, faz-se necessário um estudo das plantas medicinais, principalmente daquelas empregadas no controle da proliferação celular (tumores). As pesquisas básicas envolvendo a investigação de novos princípios ativos com ação antitumoral podem contribuir de forma fundamental para a terapia dos mais diversos tipos de cânceres, pois a possibilidade de um tratamento menos agressivo por si só poderá amenizar a dor e o estresse dos portadores desta enfermidade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Material

2.1.1.1 Agrobacterium tumefaciens

A cepa de *Agrobacterium tumefaciens* foi obtida no Instituto Agrônomo de Campinas (ICB) e mantida por repiques mensais no laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Patos de Minas

2.1.1.2 Meio de cultura enriquecido para *Agrobacterium tumefaciens*:

Reagentes utilizados:

- Sacarose
- Água destilada
- Caldo nutritivo
- Extrato de levedura

2.1.1.3 *Solanum tuberosum* (Batata)

Para a realização do experimento, foram utilizadas as variedades Binge e Monalisa da *S. tuberosum*, disponíveis no mercado de Patos de Minas.

2.1.1.4 Plantas

As espécies vegetais foram coletadas na região do cerrado de Patos de Minas; em seguida, identificadas e utilizadas para a preparação dos extratos vegetais.

2.1.2 Métodos

2.1.2.1 Meio de cultura enriquecida para *Agrobacterium tumefaciens*

Preparado com:

- 100mL de água destilada
- 0,5 g de sacarose
- 0,8 g de extrato de levedura
- 0,1g de caldo nutritivo

Misturaram-se todos os reagentes, os quais foram levados à autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 120°C.

2.1.2.2 Cultura de *Agrobacterium tumefaciens*:

Foi adicionado um "loop" de inóculo de bactéria a 50µL de meio enriquecido com extrato de levedura; o composto foi levado à incubadora por 6 horas sob agitação a temperatura de 30°C.

2.1.2.3 Inibição da indução de calos em discos de *Solanum tuberosum*

Foram colocados 50mL de suspensão estéril de Agar-agar pó a 1,5%, em placas de Petri.

As batatas foram lavadas, descascadas e colocadas em hipoclorito de sódio a 2% e tiomersal (1:1000) por 30 minutos e, em seguida, mergulhadas em água destilada estéril, por mais 30 minutos. As batatas foram cortadas em cilindros, em fluxo laminar, depois em discos, colocando-se cinco discos por placa de Petri, protegidos da luz.

O extrato de *C. langsdorffii* foi diluído com TWENN80 33%, em quatro concentrações (CL50, CL50/10, CL50/100, CL50/1000).

Para o grupo controle positivo, foram preparadas quatorze placas de Petri, onde se adicionou uma gota (50µL) de inoculo de *Agrobacterium tumefaciens* em cada disco de batata. Para cada amostra de extrato (CL50, CL50/10, CL50/100 e CL50/1000), foram feitas três repetições em uma placa de Petri com TWENN80 33% e em uma outra placa com água destilada estéril.

Para o grupo controle negativo, foram preparadas seis placas de Petri, sendo que em cada placa foram colocados cinco discos de batata. Preparou-se uma placa de Petri, para cada amostra de extrato (CL50, CL50/10, CL50/100 e CL50/1000), uma placa com TWENN80 33% e uma outra placa com água destilada estéril.

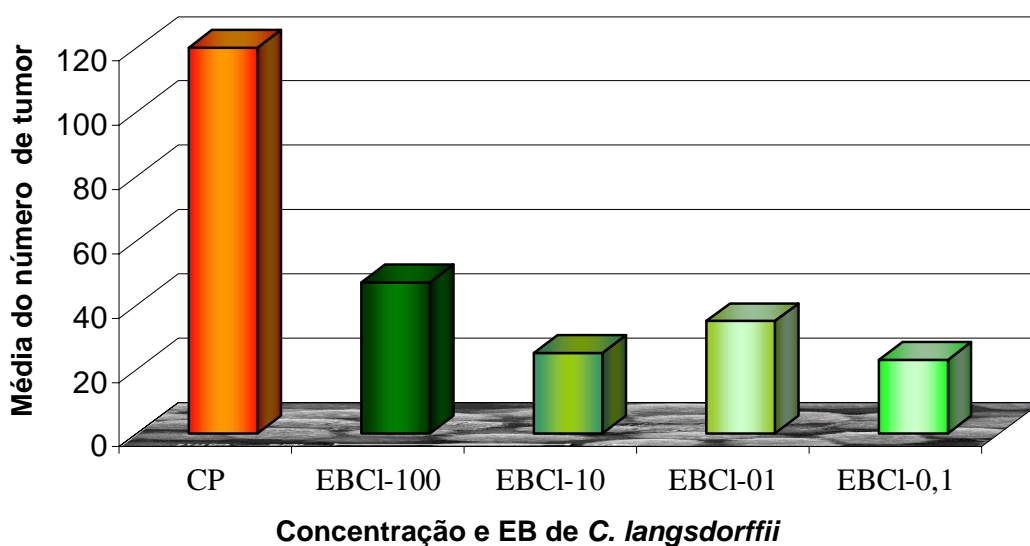
As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas a 28°C, por 30 dias. Os calos foram contados nos discos, tratados e controlados, sendo calculada a porcentagem de inibição da formação de calos (FERRIGNI *et al.*, 1982).

2.1.2.4 Preparo dos extratos vegetais

As amostras de vegetais foram selecionadas e passaram por um processo de triagem e limpeza. Logo após, foram levadas para estufa a 40°C para secarem. Após a secagem, foram trituradas no moinho de bolas e pesadas. O extrato foi feito na proporção de 100g de material seco por 1000mL de solução de etanol a 70°. O extrato permaneceu em agitação mecânica por 24 horas; após este período, o resíduo do vegetal foi retirado por filtração a vácuo. O extrato obtido foi levado ao rotavapor para retirada completa do álcool e a solução aquosa restante foi armazenada a -4°C.

2.2 Resultados

Os resultados foram obtidos após 30, 45 e 60 dias após a inoculação. Os números de tumores foram quantificados por meio de observações dos discos de *Solanum tuberosum*. O extrato de *Copaifera langsdorffii* empregado nas diferentes concentrações foi capaz de inibir significativamente a formação de calos provocados por *Agrobacterium tumefaciens* (EB100 – 60%, EB10 – 78%, EB01 – 72% e EB0,1 – 81% de inibição de calos).



Número de tumores encontrados nos diferentes grupos experimentais (EBCI-100=47, EBCI-10=25, EBCI-01=35 e EBCI-0,1=23) e grupo controle positivo (CP=122)

3 CONCLUSÃO

O extrato de *Copaifera langsdorffii* empregado nas diferentes concentrações foi capaz de inibir significativamente a formação de calos provocados por *A. tumefaciens* (EB100 – 60%, EB10 – 78%, EB01 – 72% e EB0,1 – 81% de inibição de calos). Os resultados obtidos sugerem que, nestas condições experimentais, o extrato de folha de *C. langsdorffii* possui substâncias com ação antitumoral, por controlar e inibir a proliferação celular promovida pela *A. tumefaciens*.

5 REFERÊNCIAS

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.

TIERNEY JÚNIOR, L.; M.MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A., **Diagnóstico e tratamento 2001**. São Paulo: Atheneu, 2001. 1665 p.

VEIGA JÚNIOR, V. F PINTO, A. C.,. **O gênero *Copaifera* L.** Química nova, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, março/abril. 2002.

SALGADO, M. A. S.; REZENDE, A. V.; FELFILI, J. M.; SILVA, J. C. S.; FRANCO, A. C. **Crescimento e repartição de biomassa em plântulas de *Copaifera langsdorffi* Desf. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento em viveiro**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/florestas/doc/bf70.pdf>. Acesso em: 30 julho. 2002.

OLIVEIRA, M. M. **Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal**. Disponível em: http://dequim.ist.utl.pt/bbio/66/pdf/Aplicacoes_e_Avancos_na%20Biotec_Vegetal.pdf. Acesso em: 30 julho. 2002.

SILVA, H. S. A. **Considerações sobre *Agrobacterium tumefaciens* e seu controle biológico**. Disponível em: <http://orbita.starmedia.com/~fitopatologia/agrobacterium.htm>. Acesso em: 12 ago. 2002.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. **Agrobacterium: um sistema natural de transferência de genes para plantas**. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio15/15_b.htm . Acesso em:12 ago. 2002.

STANGARLIN, J. R.; ESTRADA, K. R. F. S.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. **Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos**. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/bio/11_c.htm. Acesso em: 12 ago. 2002.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 469 p.

BEVILACQUA, F.; BENSOUSSAN, E.; JANSEN, J. M.; SPÍNOLA, F. **Fisiopatologia clínica**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 646 p.