

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA
E SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ÓLEO-RESINA DE
Eperua oleifera (Fabaceae)

FERNANDA TORLANIA ALVES GOMES

MANAUS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FERNANDA TORLANIA ALVES GOMES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA
E SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ÓLEO-RESINA DE
Eperua oleifera (Fabaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, linha de pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Dr^a. Ana Paula de Araújo Boleti

MANAUS

2014

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E SOBRE
A PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ÓLEO-RESINA DE *Eperua oleifera*
(Fabaceae)

FERNANDA TORLANIA ALVES GOMES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos farmacêuticos. Linha de pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcelos - Presidente

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof. Dr. Emerson Silva Lima - Orientador

Universidade Federal do Amazonas – FCF/UFAM

Dr^a. Ana Paula de Araújo Boleti – Co-orientadora

Universidade Federal do Amazonas – FCF/UFAM

Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga-Júnior – Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas – DQ/UFAM

Prof^a. Dr^a. Marize Campos Valadares – Membro Externo

Universidade Federal de Goiás – FCF/UFG

Manaus, 14 de abril de 2014.

Aos meus queridos avôs, Hortêncio e Antônia Alves

(In memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem pertence toda a honra e razão de todo o existir. Por me fortalecer e tornar possível todas as conquistas neste mundo.

Aos meus pais, que dedicaram a vida a me oferecerem o melhor.

À Universidade Federal do Amazonas, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo desenvolvimento da minha carreira científica e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Silva Lima, pela oportunidade concedida, pelo exemplo e ensinamentos científicos, pela sabedoria compartilhada, e toda a disposição dedicada em minha formação. Não poderia deixar de expressar minha admiração pelo renomado profissional que és nesta Universidade, e no Estado do Amazonas. Além de reconhecidamente ser uma das pessoas que abriu caminhos para o início do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFAM, idealista, pôs em prática um sonho, tornando possível hoje a qualificação de muitos alunos, para a pesquisa científica e docência. Por tudo, Gratidão!

À Dr^a. Ana Paula de Araújo Boleti, minha co-orientadora, por toda a dedicação, apoio, incentivo, disposição em ajudar, e conhecimento compartilhado.

À professora Dr^a. Marne Vasconcelos, coordenadora do PPGCF, pela oportunidade e fundamental colaboração, por toda a dedicação e motivação para o êxito do nosso curso. À Dr^a. Silvy Stuchi (USP) e querida Tati Pedrosa pela cordial receptividade em São Paulo.

Ao professor Dr. Jose Pereira M. Neto, pela amizade, pelas palavras de incentivo, pelas orientações e conhecimento proporcionado, e pela contagiante alegria.

Ao professor Dr. Valdir Veiga-Junior e ao Departamento de Química da UFAM pela essencial colaboração e apoio neste projeto.

À professora Dr^a. Maria Meneses, diretora da FCF, pelo carinho e incentivo a todos nós alunos.

À turma do Mestrado, aos amigos que aqui fiz, trazendo alegria nestes dois anos de curso, Elenn Suzany, Rodrigo Souza, Patrícia Danielle, Chanderlei, Zalina, Lucileno, Carol Ralph, Nayana, Neila, Carol Pacheco, e à querida amiga colaboradora Bárbara.

Aos meus queridos amigos Thiago Bacha, Marco Aurélio, Andrea Brandão, Carlos Montefusco, Marcus Santos, Rodrigo Sena, Anne Macedo, minha querida irmã Adriana, meu irmão Cláudio, meus amados pastores Moisés e Sidneide, por fazerem parte da minha vida e compartilharem momentos únicos, e ao querido chefe do Samu, Anderson de Paula Maciel por toda a compreensão e apoio.

Aos colaboradores da FCF, sr. José Maria, Cléo, e aos seguranças Vítor e Heuton.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro concedido.

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

É crescente a demanda do uso de plantas da Amazônia para o desenvolvimento de fármacos e cosméticos. O gênero *Eperua*, pertencente à família Fabaceae, é constituído por 14 espécies distribuídas pela Amazônia Central. O óleo-resina extraído do tronco das árvores deste gênero tem sido utilizado na medicina popular de modo similar ao da copaíba, como cicatrizante, antifúngico e bactericida. Pouquíssimos estudos foram realizados com o propósito de testar as atividades biológicas do óleo-resina destas espécies. O presente trabalho objetivou investigar os efeitos da fração ácida do óleo-resina de *Eperua oleifera* na proliferação celular e produção de colágeno em fibroblastos humanos, inibição de metaloproteinases e citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais e não tumorais. Foram avaliados os efeitos do óleo na morfologia, proliferação e produção de colágeno em fibroblastos das linhagens FPH e MRC-5. Foi avaliada a citotoxicidade da fração ácida do óleo-resina sobre seis linhagens neoplásicas e três linhagens não neoplásicas. Houve significativa citotoxicidade do óleo contra todas as linhagens avaliadas, com valores de CI_{50} entre (13 - 50 $\mu\text{g/mL}$). A indução da produção de colágeno em fibroblastos foi significativa nos tratamentos realizados a partir de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Houve redução da proliferação celular nos tratamentos com o óleo-resina na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. A avaliação do potencial hemolítico do óleo indicou toxicidade em eritrócitos de camundongos suíços *Mus musculus*, com valor de $CI_{50} = 38,29 \mu\text{g/mL}$. O teste do cometa indicou que o óleo induziu genotoxicidade nas células MRC-5 com índice de dano no DNA entre (40 - 60%) nas concentrações de 7,5 - 30 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada ação inibitória do óleo-resina na atividade de collagenases de forma concentração-dependente, com $CI_{50} = 46,64 \mu\text{g/mL}$. Ensaio zimográfico da atividade de MMP-2 e MMP-9 de células HaCaT não indicaram importante inibição enzimática quando avaliadas em baixas concentrações do óleo-resina. Os resultados obtidos evidenciaram que a fração ácida do óleo-resina de *E. oleifera* apresentou efeito citotóxico, genotóxico, hemolítico, e inibidor de collagenases. Face ao exposto, nossos dados sugerem que *E. oleifera* pode vir a ser considerada uma fonte de novos agentes quimioterapêuticos, por meio do isolamento dos compostos ativos e, possível diminuição dos efeitos tóxicos indesejáveis.

Palavras chave: citotoxicidade, *Eperua*, metaloproteinases, collagenase

ABSTRACT

There is a growing demand of using plants from the Amazon to the development of drugs and cosmetics. The *Eperua* genus belongs to the family Fabaceae and consists of 14 species distributed from Central Amazonia. The oil-resin extracted from the trunk of *Eperua* has been used in popular medicine similarly to the copaiba oil as healing, antibacterial and antifungal. Very few studies have been conducted in order to test the biological activities of the oil-resin of these species. This study aimed to investigate the effects of the acid fraction of *E.oleifera* oil-resin on cell proliferation, collagen production in human fibroblasts, inhibition of metalloproteinases and cytotoxicity against malignant cell lines. It was evaluated the effects of the oil-resin on the morphology, proliferation and collagen production in fibroblast cells MRC-5 and FPH. There was a reduction of cell proliferation of fibroblast cells treated with the oil-resin at a concentration of 5 µg/mL. The induction of collagen production in fibroblasts was significant in the treatments performed above 2.5 µg/mL relative to untreated cells. Additionally, the cytotoxicity of the oil was evaluated on three lines and six neoplastic and three non-neoplastic cell line. The results showed significant cytotoxicity against all lines, with IC₅₀ values between (13 - 50 µg/mL). The evaluation of the hemolytic potential of the oil-resin showed high toxicity in erythrocytes of Swiss mice *Mus musculus*, with IC₅₀ = 38.29 µg/mL. According to the comet assay, the acid fraction of *E. oleifera* oil-resin induced genotoxicity in MRC-5 cells with DNA damage index between (40 - 60 %) when compared to the negative controls (0-20%). Inhibitory action of the oil-resin was observed in the concentration-dependent manner on collagenase activity, with IC₅₀ = 46.64 µg/mL. The zymography assay testing the activity of MMP - 2 and MMP - 9 from HaCaT cells, showed little significant enzymatic inhibition, because of its not viable treatment in high concentrations. Results showed that the acid fraction of *E. oleifera* oil-resin showed cytotoxic, genotoxic and hemolytic effects, and collagenase inhibition. Taken together, our data suggests that *E. oleifera* could be considered as a source of new therapeutic drug, by isolating the active compounds and possibly decreasing the undesirable toxic side effects.

Key words: cytotoxicity, *Eperua*, metalloproteinases, collagenase

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACP-02	Linhagem celular de carcinoma gástrico
ANOVA	Análise de Variância (Analysis of Variance)
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
EGF	Fator de crescimento epidérmico
AFEOR	Fração ácida do óleo-resina de <i>Eperua oleifera</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HCl	Ácido clorídrico
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
IL-1β	Interleucina 1- beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases da matriz
NaOH	Hidróxido de Sódio
NHOVCAR	Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário
NF-kβ	Fator Nuclear Kappa beta
PBS	Tampão fosfato salino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil Sulfato de Sódio
SK-MEL-19	Linhagem celular de Melanoma
TGF- β	Fator de crescimento e transformação - beta
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
UV	Radiação ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de reparação tecidual.....	18
Figura 2 - Diagrama esquemático da radiação UVB.....	24
Figura 3 - A hierarquia taxonômica de espécies descritas no Brasil.....	29
Figura 4 - Estruturas de compostos fenólicos encontrados em espécies de <i>E. falcata</i>	32
Figura 5 - Estratégia experimental.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos naturais utilizados no processo de cicatrização.....	19
Tabela 2 - Inibidores naturais de metaloproteinases.....	20
Tabela 3 - Diferentes tipos de colágenos e localização nas camadas da pele.....	25
Tabela 4 - Principais metaloproteinases de matriz e seus substratos específicos.....	26
Tabela 5 - Estudo de atividade farmacológica já realizado com espécies de <i>Eperua</i>	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	Revisão da literatura.....	15
2.1	Produtos naturais.....	15
2.2	Produtos naturais para uso em cosméticos.....	16
2.3	Reparação tecidual.....	18
2.4	Inibição de metaloproteinases.....	19
2.5	Câncer e os quimioterápicos naturais.....	20
2.6	Proliferação e envelhecimento celular.....	21
2.6.1	O colágeno.....	24
2.6.2	A degradação do colágeno pelas metaloproteinases.....	25
2.7	Estudos <i>in vitro</i> em linhagens celulares.....	27
2.8	Aspectos sobre o gênero <i>Eperua</i>	29
2.9	Diterpenos.....	34
3.	OBJETIVOS.....	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Obtenção das amostras.....	37
4.3	Estratégia experimental.....	38
4.5	Cultura celular.....	39
4.6	Viabilidade celular.....	40
4.7	Curva da proliferação celular.....	41
4.8	Quantificação da síntese de colágeno – Sirius red.....	42
4.9	Zimografia.....	43
4.9.2	Western blott.....	44
4.10.	Atividade hemolítica.....	46
4.11.	Genotoxicidade.....	47
5.	Análises estatísticas.....	48
6.	RESULTADOS / DISCUSSÃO (ARTIGO).....	49
7.	CONCLUSÃO.....	80
8.	REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos compostos a partir de espécies de plantas tem crescido exponencialmente. O uso de plantas na medicina popular é bastante difundido há milênios. No entanto, tem-se a necessidade de pesquisas aprofundadas da sua real efetividade, estudos farmacodinâmicos e toxicológicos para comprovação de sua eficácia e segurança (MILLER, 2011; VIEGAS; BOLZANI, 2006; CALIXTO).

Grandes investimentos têm sido feitos na pesquisa científica na tentativa de se descobrir e obter produtos naturais biologicamente ativos. No Brasil, a utilização de plantas da flora nativa para fins terapêuticos ou de cosméticos, são na maioria das vezes realizadas com pouca ou nenhuma comprovação das suas propriedades biológicas. Nos países da Europa ou nos Estados Unidos existe uma maior rigidez por parte das agências reguladoras, no controle, registro e comercialização de produtos a partir de plantas medicinais (NEWMAN; GRAGG, 2007; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005; KINGHORN; BALUNAS, 2005).

Produtos naturais e seus derivados representam mais do que 50% de todos os fármacos em uso clínico em todo o mundo hoje. Nos últimos 40 anos, diversos fármacos foram extraídos de espécies de plantas (DEEPIKA-GUPTA *et al.*, 2008; CRAGG e NEWMAN, 2005). Essa tendência para o uso de produtos naturais com finalidade terapêutica é muitas vezes por apresentarem eficácia com efeitos nocivos menores à saúde (CALIXTO, 2005). Com o avanço da tecnologia, novas formas de análise de substâncias químicas tornaram-se acessíveis, permitindo a identificação e análise de um maior número de compostos extraídos das espécies vegetais (SHARMA; SARKAR, 2013; MILLER, 2011; AUGUSTO *et al.*, 2003; ROBBERS *et al.*, 1996).

Novas descobertas de substâncias em potencial, seja de origem natural ou sintética, possibilitam alternativas para a terapêutica de diversas doenças. Produtos naturais que possam, por exemplo, ser fonte para o desenvolvimento de fármacos no tratamento do câncer, de forma a aumentar a sobrevivência de pacientes (CAO *et al.*, 2014; SIVEEN; KUTTAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2007; VIEGAS; BOLZANI, 2006; RUBINSTEIN *et al.*, 1990).

Um dos alvos terapêuticos para impedir a progressão do câncer no organismo, é a inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs). Alguns compostos de produtos naturais atuam como inibidores de invasão tecidual pelas células tumorais. A aplicação farmacêutica desses inibidores abrange principalmente processos de metástases, e outros, como fibrose, artrite reumatoide, reparação tecidual, que envolvem a degradação da matriz extracelular (CAO *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2013; OMANAKUTTAN *et al.*, 2012; PHILIPS *et al.*, 2009; COUSSENS *et al.*, 2002).

Outras aplicações, como a utilização de substâncias naturais que reduzam ou previnam os danos causados pelo envelhecimento celular intrínseco e extrínseco, e outras desordens da pele, tem ganhado atenção nos últimos anos para o desenvolvimento de formulações dermatológicas (KISHIMOTO *et al.*, 2013; BRIGANTI *et al.*, 2013; PHILIPS *et al.*, 2009; THRING *et al.*, 2009; BAE *et al.*, 2008; STUPP *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2002; NISHIMORI *et al.*, 2001).

Espécies de plantas do gênero *Eperua* são encontradas na Amazônia Central, 14 delas já descritas na literatura, estão distribuídas na região norte, nas áreas da cidade de Manaus, outras áreas do Amazonas, sul do Equador, Guianas, e Venezuela. As árvores do gênero *Eperua* são conhecidas por terem propriedades semelhantes ao do gênero *Copaifera*. São espécies que produzem um óleo-resina utilizado para fins terapêuticos na medicina popular. Alguns dos óleos-resinas de *Eperua* possuem nomes parecidos com o das espécies de

Copaifera, como *Eperua oleifera* e *Eperua purpurea*, conhecidas como “copaíba-jacaré” e “copaibarana”, respectivamente (FLORA BRASIL, 2013; VEIGA JUNIOR e LEANDRO, 2012).

Algumas das indicações para o uso do óleo de espécies de *Eperua*, principalmente *Eperua falcata*, são empregadas na medicina popular para tratamento de úlcera, diarreia, cicatrização de feridas, antifúngico, bactericida e analgésico dental (HENRY *et al.*, 2007; DE FILIPPS *et al.*, 2004; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002). Porém, são poucos os trabalhos publicados de comprovação científica das possíveis atividades biológicas de espécies do gênero *Eperua*.

Vislumbrando o potencial farmacológico do óleo-resina de *Eperua* e reconhecendo a importância do mesmo por sua similaridade ao conhecido óleo-resina de espécies da *Copaifera* sp, foram iniciados alguns estudos das atividades biológicas da espécie *E. oleifera*. De forma preliminar, os resultados que obtivemos com o óleo-resina apresentaram-se promissores quanto à inibição de metaloproteinases e proliferação celular. Essas descobertas motivaram à elaboração do presente projeto, no intuito de conduzir a um maior conhecimento das atividades biológicas desta espécie ainda não estudada.

Tentando correlacionar os resultados experimentais iniciais e a atividade biológica do óleo-resina de *E. oleifera*, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando modelo celular com fibroblastos e queratinócitos, e também células tumorais. Trata-se, portanto de um estudo inédito sobre algumas atividades biológicas desta espécie, com metodologias aplicadas para avaliar a citotoxicidade e influência do óleo-resina de *E. oleifera* na viabilidade celular de linhagens normais e tumorais, na proliferação celular e produção de colágeno em fibroblastos humanos e inibição das MMPs, para potencial uso em produtos farmacêuticos e cosméticos.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Produtos naturais

É crescente o interesse na descoberta de produtos naturais direcionados a fármacos efetivos na terapêutica de diversas doenças (ROBINSON e ZHANG, 2011). O Brasil possui uma impressionante biodiversidade de plantas onde grande parte dela permanece desconhecida quanto ao seu potencial farmacológico (FERREIRA, 2010; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). O estudo aplicado de ativos isolados de plantas tem como alvo o desenvolvimento de novas substâncias e produtos farmacêuticos para o tratamento de doenças. A análise da atividade e a seletividade de drogas são feitas através da identificação e triagem de compostos em potencial, utilizando diversos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Esses estudos são necessários para validar cientificamente espécies já descritas na medicina popular (FERREIRA, 2010; VEIGA; PINTO, 2002).

A compreensão da flora amazônica passa pela organização e acessibilidade das informações já adquiridas a partir de milhares de coletas botânicas e armazenadas nos herbários brasileiros e do exterior. As florestas tropicais além de apresentarem elevada riqueza específica, possuem espécies com alto endemismo e raridade (FLORA BRASIL, 2013). Portanto, faz-se necessário muito esforço para descobrir, nomear, caracterizar quimicamente, e conhecer a biologia de grande parte das espécies (THOMPSON, 2010).

É comum a utilização de produtos naturais pela população de forma despreocupada quanto aos seus efeitos colaterais. Entretanto, vale ressaltar a possibilidade de os mesmos possuírem moléculas ativas que apresentem eficácia terapêutica, mas também inúmeros efeitos adversos, representando um sério problema de saúde pública (FERREIRA, 2010).

2.2. Produtos naturais para uso em cosméticos

O uso de plantas com finalidade dermatológica e não apenas cosmética é uma prática antiga e passada de geração após geração. Plantas que contenham bioativos com potencial para o tratamento da pele tem sido um foco de interesse de várias pesquisas científicas ao longo dos anos (KIM *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2011; LIM, 2006; ANDREASSI, 2004; VAYALIL *et al.*, 2004; KANG, 2003; WEI, 2001; DITRE, 1996). Dentre as possíveis aplicações dessas substâncias naturais, estão os processos de cicatrização de feridas, tratamento de doenças da pele, proteção contra radiação UV, rejuvenescimento e simplesmente o cuidado e embelezamento da pele humana (BAGATIN, 2008; VIEGAS e BOLZANI, 2006).

Grande parte das pesquisas voltadas para o desenvolvimento de produtos dermatológicos e cosméticos tem estudado substâncias obtidas de plantas. Substâncias, que apresentem possíveis atividades antioxidantes, efeitos protetores contra raios UVA/UVB, inibição da atividade de MMPs, indutores da síntese de colágeno e proliferação celular para reparação tecidual (HONG *et al.*, 2013; KIM, *et al.*, 2012; THRING *et al.*, 2009; BAUMANN, 2007; ASLAM *et al.*, 2006; BARRANTES, 2003; REYNOLDS, T.; DWECK, 1999; DUKE, 1990).

Alguns trabalhos têm avançado na pesquisa de ativos naturais para desvendar os mecanismos de ação envolvidos na síntese de colágeno. Hong *et al* (2013) num estudo com raízes de *Astragalus membranaceus*, demonstrou que o extrato inibia o fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$), considerado um mecanismo promissor pois promoveria o aumento da síntese de pró-colageno tipo I, podendo ser empregado na terapia do fotoenvelhecimento e de inflamações da pele.

Em estudo realizado por Briganti *et al* (2013), foi demonstrado que o ácido azelaico promoveu o aumento da síntese de pró-colágeno tipo I e a expressão de fatores de crescimento em fibroblastos dérmicos irradiados por UV. Os resultados deste estudo sugeriram uma possível implicação na ativação do Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), um receptor de núcleo envolvido no envelhecimento celular.

Kim *et al* (2012), realizaram um estudo do efeito do composto chito-oligossacarídeo sobre a expressão de colágeno e foto-envelhecimento, onde foi demonstrado um aumento da expressão e síntese de colágeno via inibição do fator de transcrição AP-1, e inibição da expressão de MMP-2 e MMP-9. Os resultados sugeriram que o composto poderia ser usado no desenvolvimento de produtos cosméticos específicos para prevenção e tratamento do foto-envelhecimento.

Hoi-Hin *et al* (2012) realizaram um estudo no qual foi demonstrado que Ginsenosídeo-Rb1, ativo isolado de *Panax ginseng*, induziu a expressão de colágeno tipo I através da ativação de PPAR γ . Philips *et al* (2009) realizaram um estudo dos efeitos do extrato de *Polypodium leucotomos* sobre a regulação de MMP, síntese de colágeno e de TGF- β em fibroblastos dérmicos irradiados por UV. Os resultados demonstraram que o extrato promoveu um aumento da expressão e síntese de colágeno tipo I, III e V, além de inibir a atividade das MMPs, bem como sua expressão proteica.

Esses achados na literatura demonstraram que substâncias naturais poderiam ser utilizadas no controle do metabolismo do colágeno, aumentando sua síntese e expressão em fibroblastos. Contudo, mais estudos são necessários na investigação dos efeitos dessas substâncias nos processos de reparação tecidual e proteção da pele, principalmente em termos de mecanismos moleculares.

2.3. Produtos naturais no processo de reparação tecidual

A reparação de tecidos danificados pode ser dividida em dois processos: Regeneração e cicatrização (Figura 1), este primeiro inicia-se na fase inflamatória e resulta na restituição dos tecidos perdidos, onde há um crescimento do mesmo tipo celular para a substituição da estrutura danificada. No processo de cicatrização, em situações de graves alterações e danos teciduais, ocorre substituição por um tecido conjuntivo próprio, que é a cicatriz (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

A estrutura da matriz extracelular (MEC) é essencial à cicatrização da ferida, pois promove a migração celular e contém os componentes essenciais para a reparação do tecido. É constituída por proteínas estruturais fibrosas, como o colágeno e a elastina, as glicoproteínas adesivas, fibronectina e laminina, as glicosaminoglicanas e proteoglicanas (ALBERTS, 2009; BORNSTEIN; SAGE, 2002). A cicatrização é, geralmente, uma resposta tecidual a ferimentos, processos inflamatórios e necroses. Durante a cicatrização há um aumento do número de fibroblastos ativados no local, havendo uma maior produção de colágeno (HILLING, 2011; VIEIRA, 2006; BALBINO *et al.*, 2005; OBAGI, 2004; STITES, 1992).



Figura 1 - Processo de reparação tecidual

Na (Tabela 1) estão relacionadas algumas espécies de plantas utilizadas na medicina popular como cicatrizantes, com efeitos redutores das lesões inflamatórias do tecido, melhorando a irrigação sanguínea, e diminuindo o edema.

Tabela 1 - Alguns produtos naturais utilizados no processo de cicatrização

Espécies Vegetais	Referência
<i>Aloe vera</i>	CASTRO <i>et al.</i> , 2007
<i>Aloe arborescens</i> (Babosa)	
<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula)	LIMA <i>et al.</i> , 2007
<i>Copaifera langsdorfii</i> (copaíba)	MARTINS, 2005; SILVA, 2010
<i>Jatropha multifida</i> L. (flor-de-sangue)	
<i>Leonurus sibiricus</i> L. (erva-macaé)	
<i>Petiveria alliacea</i> L. (Guiné/pipi)	LIMA <i>et al.</i> , 2007
<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass. (Arnica)	
<i>Sedum dendroideum</i> (Bálsamo/bálsamo-alemão)	
<i>Symphytum officinale</i> L. (Confrei)	

2.4. Produtos naturais inibidores de metaloproteínases

Vários produtos naturais têm sido testados quanto a sua eficácia inibitória da atividade e expressão de MMPs (Tabela 2). A inibição de MMPs pode ser considerada uma importante alternativa para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, inibidores de metástase, inibidores da degradação do colágeno e na reparação tecidual (KIM *et al.*, 2012; THRING *et al.*, 2009; SEO *et al.*, 2006; JENKINS, 2002; SAZUKA *et al.*, 1997).

São descritas substâncias naturais isoladas ou extratos de plantas constituídos de catequinas, flavonóides e carotenóides. Algumas dessas substâncias são inibidores naturais de MMPs, e sua utilização visa diminuir a progressiva degradação da MEC, causada pelo aumento da atividade das MMPs, decorrente da exposição à radiação UV (MA *et al.*, 2014; KIM, *et al.*, 2014; PAGE-MCCAW *et al.*, 2007; NISHIGORI *et al.*, 2003; INOMATA *et al.*, 2003; FREI; HIGDON, 2003; LEE *et al.*, 1999).

Tabela 2 - Alguns inibidores naturais de metaloproteinases

Produtos Naturais	Efeitos e possíveis mecanismos	Alvo terapêutico	Referências
Quercetina *Flavonóide	Inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9	Tratamento da pele Antitumoral, Fotoproteção.	VIJAYABABU <i>et al.</i> , 2006
<i>Epigallocatequina gallate</i> (EGCG) *catequina do chá verde	Inibição da ativação de MMP-1, MMP-8 e MMP-13 e da degradação do colágeno em fibroblastos dérmicos irradiados por UV-B.	Tratamento da pele fotoenvelhecimento	BAE <i>et al.</i> , 2007
<i>Polypodium leucotomos</i> *Polifenóis	Inibição de MMPs; Estimulação de TIMP e TGF- β Antioxidante, Anti-inflamatório.	Metástase, Inflamação, Fotoenvelhecimento	PHILIPS <i>et al.</i> , 2009
<i>Aloe vera</i> <i>Annona muricata</i> <i>Camellia sinensis</i>	Inibição de MMPs	Inibição de metástase	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2010
<i>Anacardium occidentale</i> (Ácido Anacárdico)	Inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9	Cicatrização de feridas	OMANAKUTTAN <i>et al.</i> , 2012
<i>Anisomeles indica</i> *Flavonóides e diterpenos	Inibição de MMP-9 via sinalização NF- κ B/AP-1	Inibição de proliferação tumoral - metástase	LIAO, <i>et al.</i> , 2012
Licopeno *Carotenóide	Inibição da expressão de MMP-9	Prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e inflamação.	PALOZZA <i>et al.</i> , 2012
Ácido azelaico	Redução da produção de MMP e de ERO, via ativação do receptor de núcleo PPAR γ . \uparrow síntese de pró-colágeno e fatores de crescimento.	Inflamação da pele, Antienvelhecimento, Fotoproteção	BRIGANTI <i>et al.</i> , 2013
<i>Astragalus membranaceus</i>	Inibição da ativação de NF- κ B e síntese de MMP-1; Aumento dos níveis de colágeno tipo I em fibroblastos dérmicos irradiados por UV-B	Tratamento da pele Fotoenvelhecimento	HONG <i>et al.</i> , 2013
<i>Rheum Palmatum</i> L	Inibição de MMP-2 e MMP-9	Inibição de metástase tumoral em células de câncer do colo.	MA <i>et al.</i> , 2014
Nobiletina <i>Citrus unshiu</i>	Supressão da expressão de MMP-9	Tratamento da pele Antienvelhecimento	KIM <i>et al.</i> , 2014

Há grande interesse em se descobrir os mecanismos de ação dos extratos vegetais com ação inibitória da atividade de MMPs que atuam em processos patológicos (YAN; BOYD, 2007; CHAKRABORTI *et al.*, 2003).

2.5. Câncer e os quimioterápicos naturais

No desenvolvimento da carcinogênese, ocorre um crescimento desordenado de células em consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos, como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (HANAHAH; WEINBERG, 2011; SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003). As células cancerosas tendem a invadir tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Caracterizam-se por proliferarem-se desordenadamente, evoluindo para a formação de tumores até o estágio de malignidade (SIEGEL *et al.*, 2012; DEVLIN, 2007; BLAGOSKLONNY, 2005).

No Brasil, as estimativas para ocorrência de novos casos de câncer em 2014 ultrapassam um total de 570.000. Dados que reforçam a gravidade e a amplitude do problema de câncer no país. Os tipos de neoplasias malignas mais incidentes serão de próstata, traquéia, brônquio e pulmão, cólon e reto, e estômago para o sexo masculino e os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão para o sexo feminino (INCA, 2014).

Muitas espécies de plantas medicinais são usadas em terapias alternativas contra os vários tipos de câncer (NEWMAN; CRAGG, 2007; PINTO *et al.*, 2002). Notáveis quimioterápicos como Vincristina, Vimblastina, Etoposídeo, Tenoposídeo e Taxol foram desenvolvidos a partir de produtos naturais para o tratamento do câncer (VIEGAS e BOLZANI, 2006). A busca por novos agentes antitumorais é necessária no intuito de obter maior eficácia do tratamento e menor efeito citotóxico em tecidos normais (MILLER, 2011).

Alguns compostos com significativa atividade biológica podem apresentar características indesejáveis, como toxicidade. A modificação estrutural de substâncias tem sido uma alternativa na descoberta de novos fármacos. A estrutura dessas substâncias pode ser

modificada visando aumentar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades indesejáveis (VIEGAS e BOLZANI, 2006; SILVERMAN, 1992).

2.6. Proliferação e envelhecimento celular

Estudos direcionados ao mecanismo de indução da proliferação celular nos tecidos cutâneos têm importante aplicabilidade e benefícios, como para tratamentos de regeneração tecidual e desenvolvimento de cosméticos (MEHTA e FITZPATRICK, 2007). Os danos celulares causados por radicais livres, exposição à radiação ultravioleta sobre a pele, alteram a produção e organização das fibras colágenas na derme. Os fibroblastos produzem a maior parte das células constituintes da matriz, principalmente o colágeno, fundamental na regeneração dos tecidos, o que torna relevante o estudo do estímulo da proliferação celular fibroblástica sob a ação de fatores endógenos e de compostos naturais que reproduzam o mesmo efeito (BORNSTEIN *et al.*, 2002).

A pele é o órgão de revestimento do corpo humano que o protege do meio exterior, compreendendo funções vitais à sobrevivência do organismo, como: termorregulação, imunidade, percepção e secreção. Possui espessura variável, dependendo da região do corpo, sendo composta por três camadas principais: epiderme (mais superficial), derme, e hipoderme, mais profunda (AZULAY, 2006).

As interações entre as camadas da pele convergem para a perfeita homeostasia dos tecidos. A habilidade que as células possuem em reconhecer e responder ao seu ambiente envolvente é à base do desenvolvimento, da reparação tecidual, da imunidade e de outras funções importantes para o seu equilíbrio (ALBERTS, 2009). A MEC, sendo substância fundamental do tecido conjuntivo, exerce funções que vão além de promover a estabilidade estrutural dos tecidos, de forma a regular o comportamento das células com as quais está em contato direta e indiretamente, influenciando a sobrevivência, migração e proliferação (COTRAN;

KUMAR; COLLINS, 2000). No tecido conjuntivo, as macromoléculas que constituem a MEC são produzidas localmente principalmente por células denominadas fibroblastos (ALBERTS, 2009;).

Os fibroblastos dérmicos são conhecidos por apresentarem numerosas funções na síntese e deposição de componentes da matriz extracelular, principalmente de colágeno. São integrantes de processos importantes como o de reparação de tecidos e desempenham importante papel na proliferação e migração celular (FRESHNEY, 2005). São consideradas células versáteis, por terem capacidade de se diferenciarem em linhagens celulares adipogênicas e osteogênicas. São células responsáveis pela produção e secreção das fibras de colágeno e elastina, assim como dos glicosaminoglicanos que fazem parte da MEC. Com o avanço da idade o número de fibroblastos diminui e se tornam menos produtivos, resultando na perda de volume da MEC devido ao decréscimo do número de fibras, macromoléculas, e consequente perda de elasticidade do tecido (GRINNELL, 2003; NOLTE *et al.*, 2008).

No processo de envelhecimento cutâneo, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para uma diminuição da produção de fibroblastos e de colágeno. O envelhecimento intrínseco é devido a variações genéticas do indivíduo e cronologicamente ocorre uma diminuição na síntese de células como fibroblastos, queratinócitos, melanócitos, dentre outros (FISHER, 2002). Esse decréscimo na produção celular enfraquece a estrutura dos tecidos da pele, promovendo o seu ressecamento, a diminuição da elasticidade e capacidade de cicatrização de feridas. Já o envelhecimento extrínseco é influenciado por fatores externos, como exposição a radiações solares, hábitos de fumar, consumo excessivo de álcool, e falta de nutrientes na dieta. Neste, ocorre uma fragmentação das fibras de colágeno e de elastina, dentre outros componentes celulares da MEC, assim como uma desorganização da estrutura da matriz (YAMAMOTO *et al.*, 2006; WEST, 1994).

Segundo Varani *et al* (2006), a fragmentação das fibras colágenas e a redução do colágeno total, caracterizam o envelhecimento cronológico da pele. Por outro lado, ocorre um aumento da atividade e expressão de MMPs e da degradação do colágeno existente. No envelhecimento extrínseco, um dos principais fatores que provocam danos à pele é a exposição à radiação UV, afetando de tal maneira a induzir o aumento da expressão proteica das MMPs (PHILIPS *et al.*, 2009; NISHIMORI *et al.*, 2001).

A radiação ultravioleta (UV) penetra a pele e interage com as diferentes células nas diferentes camadas. A radiação de ondas curtas (UVB: 290-320 nm) afeta principalmente a epiderme onde estão os queratinócitos, enquanto que as ondas mais longas (UVA: 320-400 nm) penetram mais profundamente atingindo a derme e os fibroblastos (FISHER *et al.*, 2002; SAKAI *et al.*, 2008). Na figura 2, o esquema representa a constante exposição da pele à radiação UV que induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo, dando início ao estresse oxidativo. A ativação de receptores para fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias tais como, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, induz a transcrição do fator nuclear kappa- β (NF-k β), e da proteína ativadora 1 (AP-1), moduladores do aumento da expressão de (MMP-2 e MMP-9). A AP-1 também inibe a expressão do RNAm para o pró-colágeno tipo 1, nos fibroblastos a (HONG *et al.*, 2013).

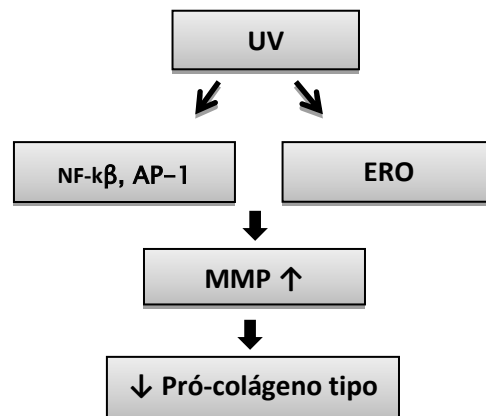


Figura 2 - Diagrama esquemático da radiação UVB sobre o aumento da produção e expressão de MMPs estimulada pelo fator NF-k β e a diminuição do pró-colágeno I.

2.6.1. O colágeno

O termo colágeno há muito tem sido associado a produtos cosméticos para prevenção e tratamento dos sinais de envelhecimento da pele, como creme anti-rugas e também produtos cicatrizantes (VARANI *et al.*, 2006). Trata-se, portanto de uma família de proteínas, abundante nos mamíferos e que constitui cerca de 30% de sua massa proteica total (Tabela 3). O colágeno pode ser considerado o principal componente da pele e dos ossos, são proteínas estruturais que proporcionam sustentação e firmeza à pele (BLUM; RUGGIERO, 2005).

O colágeno apresenta uma estrutura terciária e quaternária, bastante enovelada, formada por três polipeptídeos, denominados cadeia α . O entrelaçamento dessas cadeias forma uma hélice singular, diferente da α -hélice, com um superenovelamento orientado para a esquerda. Quantitativamente, os aminoácidos presentes na molécula de colágeno são aproximadamente de 35% de glicina, 11% alanina e 21% de Prolina e Hidroxiprolina (LEHNINGER, 2006).

Tabela 3 - Diferentes tipos de colágenos e localização nas camadas da pele¹

Tipos de colágeno	Cadeias	Síntese/ Localização
I	α_1, α_2	Fibroblastos/Derme
III	α_1	Fibroblastos/Derme
IV	$\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3 \alpha_4 \alpha_5$	Células epiteliais/Membrana basal
V	$\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$	Fibroblastos/Derme
VI	$\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$	Derme
VII	α_1	Células epidérmicas/Junção dermo-epidermal
VIII	$\alpha_1 \alpha_2$	Membrana basal associada a colágenos
XIII	α_1	Colágenos de membrana
XV	α_1	Membrana basal associada a colágenos
XVII	α_1	Colágenos de membrana
XXIII		Colágenos de membrana

¹ Adaptado de (BLUM; RUGGIERO, 2005).

2.6.2. A degradação do colágeno pelas Metaloproteinasas

As MMPs são um grupo de enzimas (endopeptidases) envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular e da membrana basal. Desempenham função importante em condições fisiológicas como na morfogênese, diferenciação celular, remodelamento de tecidos, e ainda em condições patológicas, como na inflamação, artrite, doenças cardiovasculares, pulmonares, e invasão tumoral (VISSE e NAGASE, 2003).

As MMPs são denominadas metal-dependentes por conterem íons Zn^{2+} no sítio de ação catalítica e requererem íons Ca^{2+} para sua estabilidade e atividade. São vários os tipos celulares que produzem as MMPs, principalmente os leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células mensenquimais. Inicialmente as MMPs são secretadas na forma de pró-enzimas inativas (zimógenos), denominadas pró-MMPs, sendo ativadas a partir da clivagem de seus pró-peptídeos, pela quebra da ligação de cisteína Zn^{2+} , bloqueadora do local ativo (PAGE-MCCAWE, 2007).

Tabela 4 - Principais MMPs e seus substratos específicos¹

Enzima	Tipo	Massa molecular(kDa)	Substratos
Colagenase	MMP-1	55/45	Colágeno I/II/III/VII/X
Gelatinase	MMP-2	72/66	Gelatina, Elastina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI, Fibronectina, Laminina
Estromelisina	MMP-3	57/45	Proteoglicanos, Laminina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI
Matrisilina	MMP-7	28/19	Proteoglicanos, Laminina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI
Colagenase	MMP-8	75/58	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina
Gelatinase	MMP-9	92/86	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI
Colagenase	MMP-13	60/48	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina

¹Adaptado de (McCAWLEY e MATRISIAN, 2000)

O balanço entre produção e atividade das MMPs com seus inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMP) ocorre de forma endógena para manter a integridade tecidual. A

atividade exacerbada das MMPs ocasionada por diversos fatores pode induzir uma destruição desordenada dos tecidos, por isso têm-se a necessidade de manter sob controle a regulação da atividade dessas enzimas desintegradoras de matriz (BAKER *et al.*, 2002; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2008).

Diversas patologias estão associadas a alterações da homeostasia entre as MMPs e TIMPs, pelo fato de esse desequilíbrio promover uma degradação não controlada da MEC. Dentre as doenças relacionadas com esta disfunção são descritas, artrite, doenças cardiovasculares, neurológicas, fibroses, vários tipos de câncer, onde a progressão é devido a degradação da matriz favorecer a invasão e metástase (CLARK *et al.*, 2008; STAMENKOVIC, 2000; NAGASE; WOESSNER, 1999).

2.7. Estudos *in vitro* em linhagens celulares

Dentre as formas de estudos de avaliação de compostos naturais, os métodos *in vitro* apresentam uma série de vantagens, tais como: Permite o uso de células de origem humana, têm baixo custo, são reprodutíveis, oferece maior número de variáveis experimentais, possibilita a interpretação e elucidação de mecanismos celulares e moleculares (HELGASON e MILLER, 2005).

Com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), os testes *in vivo*, em alguns casos, tornaram-se dispensáveis, sendo a cultura de células o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (BRASIL, MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2012; MORAES *et al.*, 2007). No processo de descoberta de novos fármacos, a cultura de células fornece uma importante ferramenta para o estudo da citotoxicidade definindo o potencial de morte celular e as alterações morfológicas

causadas pela substancia em teste (PERES, 2005; CAZARIN *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2001).

Os testes de citotoxicidade permitem a avaliação *in vitro* dos compostos naturais e seus efeitos nas células em cultivo, observando os parâmetros de crescimento, diferenciação, porcentagem de morte celular e concentração do produto que iniba 50% do crescimento celular (CI₅₀). Nesses ensaios, várias linhagens celulares podem ser utilizadas e, no intuito de avaliar o índice de seletividade (IS) do fármaco para linhagens neoplásicas, utilizam-se também linhagens de células normais. São métodos considerados importantes para a avaliação da citotoxicidade, pois somados a outros critérios de toxicidade podem respaldar a avaliação de segurança do uso de determinada espécie vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2009; HOUGHTON *et al.*, 2007).

A avaliação do potencial hemolítico é um dos modelos experimentais utilizados para o estudo da toxicidade *in vitro*. Neste, é possível analisar os danos eritrocitários causados por determinada substância em teste. A membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que ao ser exposta a determinados compostos pode ser irreversivelmente danificada, sofrer lise, liberando hemoglobina ao meio extracelular (BAIN, 2007). O teste de hemólise *in vitro* é utilizado para triagem de substâncias estimando a toxicidade e o dano que poderiam induzir *in vivo*, no organismo humano (OLIVEIRA *et al.*, 2009; APARICIO, 2005; AKI e YAMAMOTO, 1991).

2.8. Aspectos sobre o gênero *Eperua*

A nomenclatura do gênero *Eperua* foi descrita pela primeira vez em 1775 no trabalho intitulado *Histoire des plantes de la Guiane française*. A partir deste trabalho, diversos pesquisadores descobriram novas espécies, durante expedições ao longo da América do Sul. Richard S. Cowan, pesquisador do departamento de botânica de Washington, publicou em 1975, um dos conhecidos compêndios relacionados ao gênero, denominado “*A monograph of the Genus Eperua*”. Neste trabalho foram descritos aspectos morfológicos, anatômicos, ecológicos, fenológicos e geográficos de cerca de 14 espécies do gênero *Eperua*. Desde então, vários autores descreveram espécies encontradas no Brasil, principalmente na Amazônia.

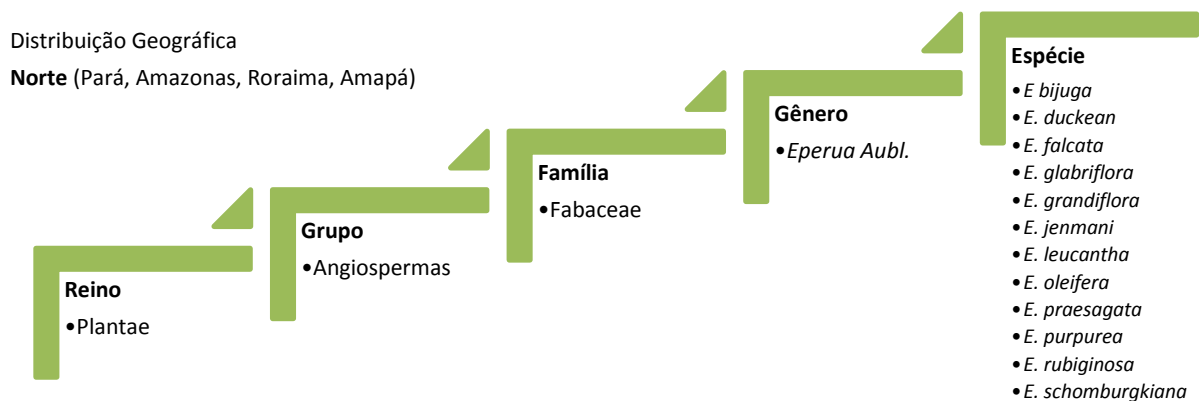


Figura 3 - A hierarquia taxonômica (FLORA BRASIL, 2013), de espécies descritas no Brasil

Ducke, pioneiro no estudo de espécies leguminosas no Brasil, em 1940 descreveu duas espécies em cultivo no Jardim Botânico do Rio de Janeiro: *E. oleifera*, conhecida como “copaíba-jacaré”, *E. bijuga*, e *E. purpurea*, nome popular “copaibarana”. Em seu trabalho, ele cita outro nome popular frequentemente usado na Amazônia, “muirapiranga” para algumas espécies do gênero. As espécies do gênero *Eperua* são conhecidas de forma similar

as da *Copaifera*, devido à produção de um óleo resinoso extraído de seu caule (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; DUCKE, 1940).

Segundo Veiga-Junior (2002), algumas espécies do gênero *Eperua* produzem óleos mais resinosos e de coloração diferente, esverdeados, um pouco diferente dos produzidos por algumas espécies de *Copaifera*, que inclusive pertencem à mesma família e subfamília do gênero *Eperua*. As espécies de *Eperua* apresentam hábito arbóreo, sendo árvores de grande porte, com exceção de algumas espécies como *Eperua oleifera* var. *campestris* que são bastante pequenas (DUCKE, 1939; COWAN, 1975).

O uso terapêutico de espécies de *Eperua* foi popularmente difundido entre povos da Amazônia e da Guiana, como descrito no trabalho intitulado “*Pharmacopées traditionnelles em Guyane: Créoles, Palikur, Wayapi*” (GRENAND *et al.*, 1987). Neste, são apresentadas algumas propriedades medicinais das espécies de *Eperua*, principalmente *E. falcata*, tais como, o uso do óleo-resina na cicatrização de feridas, no tratamento de úlceras, como antifúngico, antibactericida, a decocção das folhas para tratar disenterias, como analgésico dental, e antirreumático (GRENAND *et al.*, 1987, GOURNELES *et al.*, 1986).

Veiga-Junior e Leandro (2008) publicaram um estudo fitoquímico e sobre a atividade antioxidante das cascas de *Eperua glabriflora* e *Eperua duckeana*. Neste trabalho, os autores descreveram algumas características, dos óleos extraídos de outras espécies, tais como, *E. oleifera*, *E. purpurea* e *E. falcata*, que são utilizados na medicina popular para fins medicinais semelhantes ao da copaíba, como cicatrizante, antifúngico e bactericida. Os resultados deste trabalho comprovaram a atividade antioxidante das espécies supramencionadas, e dados da espectrometria de massa detectaram a presença de triterpenos, ácidos graxos, ácidos diterpênicos, esqualeno, α -tocoferol, e os esteróis: campesterol, estigmasterol e β -sitosterol nas duas espécies.

Quimicamente, o gênero *Eperua* apresenta uma diversidade de compostos secundários, principalmente de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e flavonóides, com a maior parte dos estudos já publicados relacionados às espécies de *E. purpurea*, *E. leucantha*, *E. falcata*, *E. bijuga* e *E. grandiflora* (Quadro 1), (BRAZ *et al.*, 1973; MAIA e ANDRADE, 2009; MAIA e ANDRADE, 2009; LEANDRO e VEIGA-JUNIOR, 2012).

Quadro 1 - Principais constituintes químicos já identificados do gênero *Eperua* ¹

Diterpenos		Compostos fenólicos	
Cetonas	14,15-bisnor-labda-13-ona	Ácidos fenólicos	ácido gálico
	9-metil-14,15,20-trinor-labda-1(10)-eno-13-ona		Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico
	14,15-bisnor-labda-13-ona	Flavonóides	catequina
Ésteres	eperuato de metila		<i>epicatequina</i>
	abda-8(17)-eno-15-oato de labda-8(17)-eno-15-ila		(4-hidroxi-benzoil) <i>epicatequina</i>
Álcoois	labda-8(17)-eno-15-ol		tricina
	labda-8(17),13E-dieno-15-ol		engeletina
Ácidos labdanos	ácido labda-8(17)-eno-15-óico (ácido eperúico)		isoengelentina
	ácido labda-8(17),13E-dieno-15-óico (ácido copálico)		neoengelentina
	ácido <i>ent</i> -copálico		neoisoengelentina
	ácido labda-7-eno-15-óico (ácido catívico)		astilbina
	ácido 7-oxo-labda-8-eno-15-óico		neoastilbina
Ácidos Clerodanos	ácido (-)-7-oxo-labda-8,13E-dieno-15-óico		dihidrocampferol
	ácido (-)-cleroda-7,13E-dieno-15-óico		
	ácido (-)-2-oxo-cleroda-3,13E-dieno-15-óico (ácido 2-oxo-covalênico)		
	ácido (-)-7 β -hidróxicleroda-8(17),13E-dieno-15-óico		
	ácido <i>nor</i> -hardwíkiico		
	ácido 16-oxo-13,14H-hardwíkiico		
Sesquiterpenos			
(E)cariofileno			

¹Adaptado de: Veiga Junior e Leandro, 2012; Royer *et al* 2010; Maia e Andrade, 2009; Amusant *et al.*, 2007; Ávila e Medina, 1993; Ávila *et al.*, 1992; Villeneuve *et al.*, 1988; De Santis e Medina 1987; Maillo *et al.*, 1987; Maia e Godoy, 1984; Braz Filho *et al.*, 1973; King e Jones, 1955.

No trabalho desenvolvido por Leandro e Veiga-Junior (2012), os diterpenos identificados nos óleos de espécies de *Eperua* pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano, tendo como principais constituintes químicos diterpenos labdânicos. Esses resultados vêm corroborar com o trabalho de King e Jones (1955) o qual refere sobre a rica composição dos óleos-resinas de *E. falcata* e de outras espécies de *Eperua* da Guiana Inglesa em diterpenos. Aproximadamente 85% da composição de diterpenos eram de ácido eperúico, o qual recebeu este nome por ter sido isolado pela primeira vez em espécies do gênero *Eperua* (LEANDRO e VEIGA-JUNIOR, 2012).

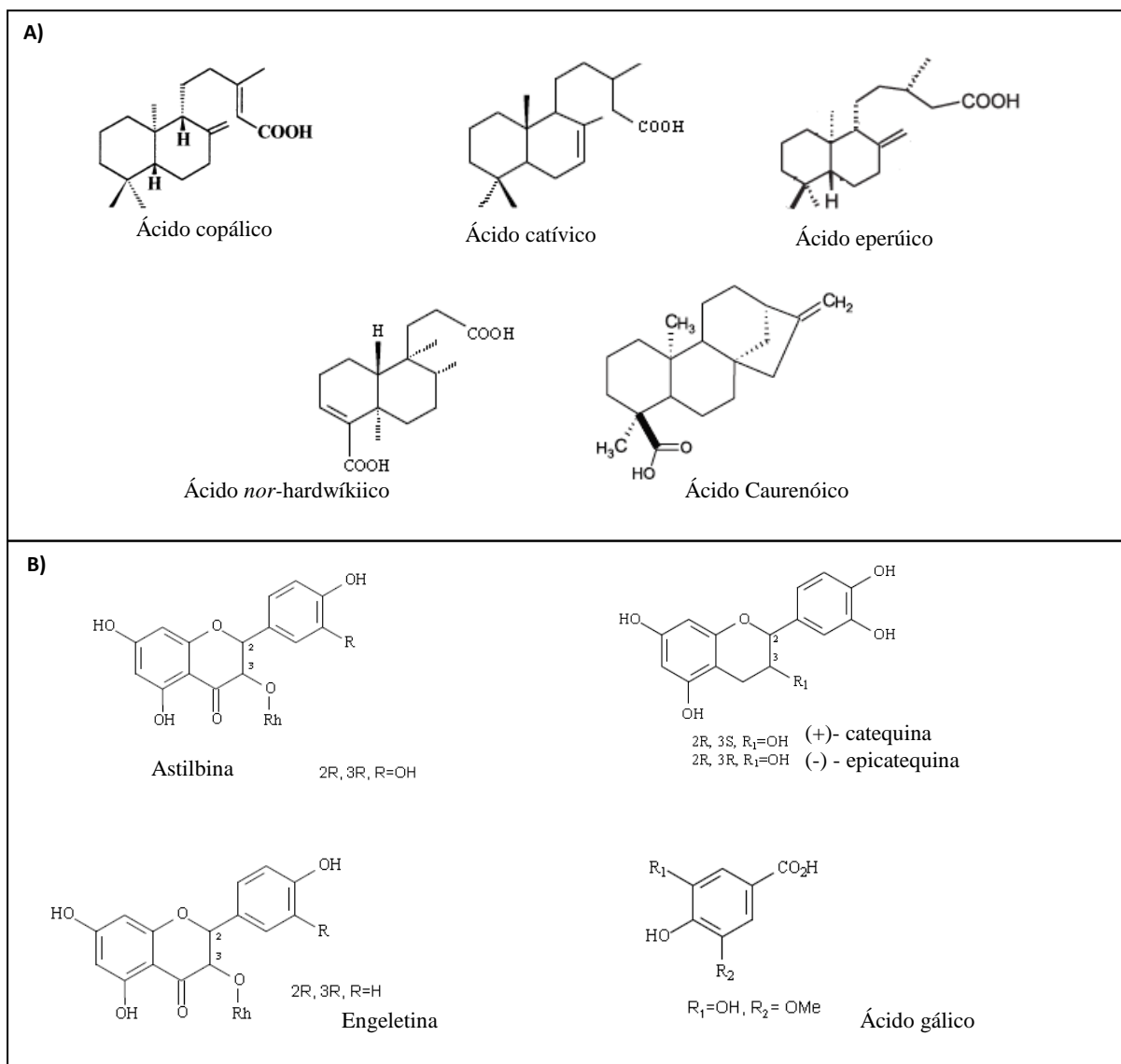


Figura 4. (A) Estruturas de diterpenos labdânicos, clerodânicos e caurânicos e (B) de compostos fenólicos encontrados em espécies de *E. falcata* (Fonte: Leandro e Veiga-Junior, 2012).

Os diterpenos ilustrados na (Figura 4) já foram também identificados e isolados de algumas espécies de *Copaifera*, tendo, portanto grande similaridade na composição do óleo-resina quanto à estrutura labdânica e clerodânica (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; LEANDRO e VEIGA-JUNIOR, 2012).

Tabela 5 - Estudos das atividades biológicas com espécies de *Eperua*

Espécie	Parte da planta	Estudo/ Resultados	Referências
<i>E. grandiflora</i>	Galhos ¹	Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i>	ROVIRA <i>et al.</i> , 1999
<i>E. falcata</i>	Casca ¹	Ação anti-radicalar	PAULY <i>et al.</i> , 2003 PAULY <i>et al.</i> , 2005
		Ação anti-UVA e UVB	
		Inibição de colagenase	
		Inibição de Tirosinase	
	Ácido eperúico ² Ácido catívico ² Ácido labda-8-eno-15-óico ²	Ativador do crescimento celular Inibição de melanina Aceleração da produção de colágeno	TAMAI <i>et al.</i> , 1999 TAMAI <i>et al.</i> , 2001 YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2005
Casca ¹	Citotoxicidade (-) Inibição de neuropeptídios	HENRY <i>et al.</i> , 2007	
Astilbina ² Engeletina ²	Ação anti-inflamatória Ação anti-UVB		
<i>E. glabriflora</i> <i>E. duckeana</i>	Casca ¹	Antioxidante	LEANDRO e VEIGA-JUNIOR, 2009

¹Preparações em extrato aquoso e etanólico da casca da árvore de *E. falcata*. ² Composto isolado da resina de *E. falcata*.

Conforme exposto na (Tabela 5), os trabalhos encontrados na literatura sobre o óleo-resina de *Eperua* são escassos, e pouquíssimos compostos isolados das espécies do gênero foram estudados. A espécie mais conhecida quanto à sua atividade biológica é *E. falcata*, tendo inclusive gerado algumas patentes na área de cosméticos. Pauly e Moretti (2003a, 2003b e 2005) patentearam formulações contendo o extrato de *E. falcata* para produtos

cosméticos com ênfase no rejuvenescimento da pele. Vários desses produtos com apresentações em creme e loções já estão no mercado europeu, licenciados por marcas renomadas como VICHY® e L'ORÉAL PARIS®.

Yamamoto *et al* (2005) também depositaram patente contendo a mistura dos ácidos eperuico, catívico e labda-8-eno-15-óico, derivados da resina de *E. falcata*, *Copaifera*, e *Cistus ladaniferus* respectivamente, desenvolvida para acelerar a produção de colágeno em células da pele. São resultados importantes considerando que esses três compostos foram também identificados em espécies de *Eperua* no trabalho desenvolvido por (LEANDRO e VEIGA-JUNIOR, 2012), podendo ser uma fonte de princípios ativos para novos estudos.

2.9. Diterpenos

Os terpenóides constituem um complexo e diversificado grupo de metabólitos secundários. Considerado o segundo maior grupo em termos de relevância farmacológica, contendo aproximadamente 35.000 substâncias já descritas (DEWICK, 2009; VERPOORTE e ALFERMANN, 2000). São derivados de unidades isoprênicas pentacarbonadas, e classificados quanto ao número de unidades de isopreno em sua estrutura. Apresentam-se como monoterpenos (2 unidades, 10C), sesquiterpenos (3 unidades, 15C), diterpenos (4 unidades, 20C), triterpenos (6 unidades, 30C) e carotenóides (8 unidades, 40C), (DEWICK, 2009).

A investigação prospectiva da composição do óleo-resina de *Eperua oleifera* evidenciou a presença do ácido caurenóico, um diterpeno caurânico. Os diterpenos caurânicos apresentam ampla distribuição no reino vegetal, sendo normalmente encontrados em baixas concentrações (CAVALCANTI, 2006). Algumas espécies do gênero *Copaifera*, *Xylopi*,

Annona e *Mikania* spp, apresentam teores elevados de diterpenos caurenóicos (OLIVEIRA; BRAGA, 2003). Dentre as atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* já relatadas na literatura para o ácido caurenóico, incluem atividades citotóxica, genotóxica, antimicrobiana, antiparasitária, inibidora do apetite de insetos, hipotensora e antiinflamatória (CAVALCANTI, 2006; TIRAPELLI *et al.*, 2004; PAIVA *et al.*, 2003; De MELO *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 1999; GHISALBERT, 1997; DAVINO *et al.*, 1989; BOAKYE-YIDOM *et al.*; 1977).

Costa-Lotufo *et al* (2002) descreveram algumas atividades do ácido caurenóico isolado de *C. langsdorffii*, tais como, ação anti-proliferativa contra células tumorais, efeito hemolítico em eritrócitos humanos e murinos, e embriotoxicidade em embriões de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*). Cavalcanti (2006) descreveu os efeitos citotóxicos e genotóxicos em linfócitos humanos e mutagênico nas células de levedura de *S. cerevisiae* do ácido caurenóico isolado de *C. langsdorffii*.

Ohsaki *et al* (1994) realizaram um estudo com os diterpenos colavenol e ácido hardwíckiico, no qual descrevem potente atividade antitumoral desses compostos contra carcinoma em camundongos. O ensaio foi realizado após o fracionamento cromatográfico de óleos-resina de *Copaifera langsdorffii*.

Considerando os diversos trabalhos realizados no Brasil visando o estudo fitoquímico e farmacológico de diterpenos (CAVALCANTI, 2006; PINTO E VEIGA-JUNIOR, 2002; VIEIRA *et al.*, 2002; MONTI *et al.*, 1996; GHISALBERT, 1997), e a presença do ácido caurenóico, ácido hardwíckiico e ácido eperúico em óleo-resina da espécie *Eperua oleifera*, busca-se também neste trabalho estabelecer relações entre a composição química do óleo e suas atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade biológica da fração ácida do óleo-resina de *E. oleifera* quanto à sua citotoxicidade em linhagens celulares normais e tumorais, e seus efeitos na proliferação celular, produção de colágeno e inibição de metaloproteinases em fibroblastos humanos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade em linhagens celulares humanas de fibroblastos (MRC-5) e queratinócitos (HaCaT).
- Avaliar os efeitos na proliferação celular e síntese de colágeno em cultura de fibroblastos humanos;
- Avaliar o efeito inibitório sobre a atividade e expressão proteica de MMPs;
- Avaliar a citotoxicidade nas linhagens celulares tumorais, SKMEL19, HCT116, MCF-7, ACP-02, ES-2 e NHOVCAR.
- Avaliar o potencial hemolítico em eritrócitos murinos;
- Avaliar a indução de genotoxicidade em fibroblastos humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo de Estudo

O projeto trata de um modelo de estudo experimental, onde foi avaliada a ação do óleo-resina de *E. oleifera* na viabilidade celular de células normais e tumorais, na proliferação celular e produção de colágeno em fibroblastos humanos e na inibição de MMPs. Neste trabalho foi utilizada uma associação de metodologias baseadas em sistemas *in vitro*, buscando esclarecer os mecanismos de ação envolvidos.

4.2. Obtenção de amostras:

As amostras do óleo-resina de *E. oleifera* foram coletadas no município de Manicoré-AM e partes da planta foram enviadas ao herbário da UFAM para confirmação da espécie. O óleo-resina bruto e frações foram obtidos por partição com diferentes solventes orgânicos e utilizando cromatografia em coluna aberta em sistema normal, em sílica, com solventes em gradiente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por métodos cromatográficos (Cromatografia em fase gasosa) acoplada a métodos espectrométricos (Espectrometria de massas) e também por métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C). Os constituintes das frações foram identificados pela similaridade dos espectros com dados da literatura e padrões disponíveis no próprio laboratório.

4.3. Estratégia experimental

As etapas experimentais foram iniciadas a partir da obtenção da fração ácida do óleo-resina de *E. oleifera*. A figura 5 ilustra os estudos realizados *in vitro*, utilizando modelo de cultura de células, em diferentes ensaios.

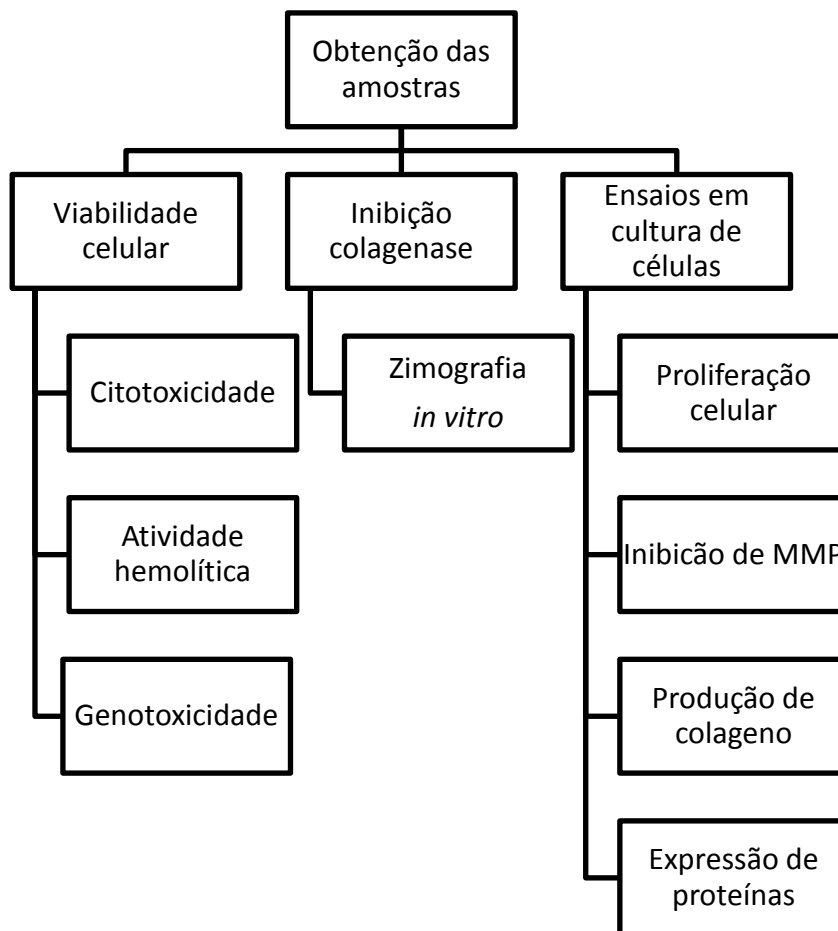


Figura 5 – Estratégia experimental

4.5. Cultura celular

Neste estudo foram utilizados linhagens normais de fibroblastos primários (FPH) e queratinócitos humanos (HaCaT), cedidos pela Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo); fibroblastos humanos (MRC-5) e células tumorais de melanoma (SKMEL19), carcinoma colorretal humano (HCT116), adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma gástrico (ACP-02), adenocarcinoma de ovário (ES-2 e NHOVCAR), cedidos pelo laboratório de citogenética humana da Universidade Federal do Pará. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” (DMEM), alta glicose, suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal (SFB, GIBCO), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL), mantidas em estufa a 5% CO₂ e 37 °C atmosféricos. Após o período necessário para atingir 70% a 80% de confluência, as células foram expandidas em novas garrafas estéreis, até obter quantidade necessária para os experimentos. Para a realização dos experimentos *in vitro*, após confluência necessária, as células foram desprendidas com solução de Tripsina-EDTA 0,05%, neutralizadas com o mesmo volume de meio DMEM, centrifugadas duas vezes por 10 minutos a 1500 rpm (rotações por minuto), ressuspensas em meio de cultura. A concentração celular foi ajustada em câmara de Neubauer, com viabilidade superior a 97%.

4.6. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método Alamar Blue® segundo NAKAYAMA *et al* (1997). As linhagens celulares normais (FPH, MRC-5, HaCaT) e tumorais (SKMEL19, HCT116, MCF-7, ACP-02, ES-2, NHOVCAR), foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço (100 μ L de meio DMEM com SBF 10%) em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com o óleo-resina nas concentrações de (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 μ g/mL). O experimento foi realizado em triplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72 h). Como controle positivo de morte, foi utilizada a Doxorrubicina nas concentrações de (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 μ g/mL) e determinado o valor de CI_{50} . Para controle negativo apenas o meio de cultura com DMSO a 0,01%. Após o período de tratamento (24, 48 e 72 h) foi adicionado 10 μ L de resazurina 0,4% (diluição 1:20). O período de incubação padronizado para as linhagens celulares descritas acima foi de 3 horas, tempo necessário para a metabolização da resazurina.

Os dados da leitura de fluorescência emitida pelas células tratadas e pelo controle (sem tratamento), foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (Non-linear regression (curve-fit) Sigmoidal dose-response), para o cálculo da CI_{50} . O ensaio foi realizado em triplicata de amostras e experimentos.

4.7. Curva de crescimento e proliferação celular

O ensaio consistiu na avaliação da curva de crescimento e proliferação celular pelo método de exclusão por Azul de Tripiano (FRESHNEY, 1994) com modificações. As células de fibroblastos FPH e MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10%) em placas de 12 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂. Após atingirem uma confluência celular de 80% da superfície ocupada, as células foram tratadas nas concentrações não citotóxicas (0,625; 1,25; 2,5 e 5 µg/mL) do óleo-resina, determinadas previamente pelo ensaio de viabilidade celular.

O estudo de proliferação teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com o óleo-resina. Após tripsinização, e inativação com meio e PBS, foram utilizados 90 µL da suspensão celular que, por sua vez, fora adicionado 10 µL de azul de Trypan. Desta suspensão celular foram transferidos 10 µL para a câmara de Neubauer e as células contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis).

Para o cálculo do número de células de cada poço foi utilizada a seguinte equação matemática: $NC \times D \times 10^4 / Q$, onde NC = número de células viáveis contadas; D = diluição da amostra (10) e Q= número de quadrados da câmara de Neubauer (= 4) usados para contagem das células. Como controle negativo, as células foram mantidas sem tratamento, contendo apenas o meio de cultura DMEM acrescido de DMSO 0,1% (o solvente utilizado para dissolver o óleo-resina). Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (Two way /ANOVA/ post-test Bonferroni). O ensaio foi realizado em triplicata de amostras e experimentos.

4.8. Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos

Para quantificar a produção de colágeno solúvel no sobrenadante das culturas celulares, utilizamos o ensaio colorimétrico Picrosirius (Sirius-Red), método descrito por (JONES *et al.*, 2013), com modificações. As células de fibroblastos FPH e MRC-5 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 24 poços e incubadas com o óleo-resina nas concentrações de (1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) com amostras em triplicata, por 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento das células, o sobrenadante das culturas foi removido para avaliação do colágeno solúvel e armazenado em uma placa espelho de 96 poços. A placa foi colocada sem tampa em estufa a 37 °C “*overnight*” para a secagem do seu conteúdo. Em seguida, adicionou-se 200 μL de solução de Bouim saturada e incubadas por uma hora. O fixador foi removido e adicionou-se 300 μL de água destilada em cada poço. A placa foi seca em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após este período, acrescentou-se 200 μL do corante Picrosirius 0,1% por uma hora, sob leve agitação e proteção da luz. O corante foi removido cuidadosamente adicionou-se 250 μL de HCl 0,01 M para a remoção do corante não aderido. A solução de HCl foi removida e adicionou-se 150 μL de NaOH 0,1 M por 30 minutos sob leve agitação. O conteúdo da placa foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão de colágeno foi preparada a partir de uma solução de colágeno tipo I from “*rat-tail*” (Sigma®) diluída em PBS e meio de cultura DMEM sem soro, nas concentrações finais de (30; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 $\mu\text{g/mL}$). Os valores médios foram plotados em gráfico de dispersão com as concentrações conhecidas de colágeno, com os valores do eixo X e as absorvâncias correspondentes a cada concentração com os valores do eixo Y e calculado a equação da reta e o coeficiente de correlação R. Foram realizados três experimentos em triplicata e os dados analisados utilizando o programa GraphPad Prism® (Two way /ANOVA/ post-test Bonferroni).

4.8.1. Quantificação de colágeno depositado na matriz extracelular

Para a fixação das células aderidas nas placas, foram adicionados 100 µL de álcool a 70% gelado, e em seguida mantidas durante 10 minutos no freezer a - 80 °C para a completa fixação do material celular. Logo em seguida, foi removida a solução de álcool, cada poço lavado com água destilada, e as placas secas, em temperatura ambiente. Após a secagem foram adicionados 100 µL da solução de Picosirius e as placas mantidas a 37 °C por duas horas. Cada placa foi lavada em água corrente para retirar o excesso do corante e seca em temperatura ambiente. Com o material seco, procederam-se as fotomicrografias das culturas celulares em microscópio invertido de luz polarizada (Leica®).

4.9. Ensaio de inibição da colagenase por método zimográfico *in vitro*

A atividade proteolítica de MMPs foi avaliada pelo ensaio zimográfico e eletroforese em gel (poliacrilamida 10%, gelatina 0,1%), segundo o método descrito por (SALAMONE *et al.*, 2012; SNOEK-VAN BEURDEN, 2005), com algumas modificações. Cada poço do gel foi carregado com amostras do óleo-resina nas concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) e brevemente solubilizadas em tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 5%; 0,01% azul de bromofenol e 25 µg/mL de colagenase (from *Clostridium histolyticum*) da Sigma. A eletroforese (BioRad Protean II, Hercules, USA) foi realizada sob condições redutoras (0,025 M TRIS, 0,192 M glicina, e 0,1% SDS, pH 8,5) à 100 V constante por 150 min. Após isso os géis foram lavados duas vezes por 30 min em 2,5% Triton X-100 (v/v) para remover o SDS e em seguida incubados a 37°C, overnight em solução tampão (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 50 mM). Após este período, o gel foi corado pelo corante Comassie Blue G-250 e descorado com uma solução de metanol e ácido acético até a visualização das bandas características da atividade das colagenases. A avaliação

da atividade enzimática foi feita através do software ImageJ[®]. Os resultados foram analisados utilizando o programa Origin 6.0[®] (Non-linear regression (curve-fit)), para o cálculo da CI₅₀. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras e experimentos.

4.10. Efeito do óleo-resina de *E. oleifera* na atividade de colagenases em cultura celular

4.10.1. Obtenção das proteínas coletadas do meio de cultura

Para o ensaio zimográfico, as células HaCaT e MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 de células/mL em placas de 24 poços, com meio DMEM contendo SBF 10%. Após o tempo de 24 horas para a aderência celular, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e os fibroblastos incubados por 48 h com o óleo-resina nas concentrações de (1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em meio DMEM sem SBF. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. As proteínas do meio de cultura foram quantificadas segundo o método descrito por (Lowry *et al.*, 1951).

Para separação das proteínas, foi preparado o gel SDS-PAGE com 10% de acrilamida e 1% de gelatina, em tampão (Tris-HCl 0,4 M, pH 8,8, contendo SDS 0,1%, TEMED 0,01% e persulfato de amônio 0,05%) e adicionadas a cada poço uma quantidade de (30 μg) de proteínas, previamente incubadas com tampão de amostra (Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002%), e então submetidas à eletroforese.

A eletroforese foi realizada no sistema Bio-Rad Miniprotean II system (Bio-Rad Laboratories), com duração de 2 h a 120 v. Após esta etapa, os géis foram lavados duas vezes por 30 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para a remoção do SDS. Os géis foram então incubados “*overnight*” em solução tampão de tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM CaCl₂ e 1 mM ZnCl₂, no banho-maria a 37 °C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue, e descorados com uma solução de metanol e ácido acético até a

visualização das bandas características da atividade das colagenases. As áreas degradadas pelas enzimas aparecem como bandas claras contra um fundo azul escuro. As determinações das massas moleculares foram feitas com referência ao padrão de proteína pré-estabelecido, co-eletrorizado nos géis. A avaliação da atividade enzimática foi feita através do software ImageJ®.

4.11. Efeito do óleo-resina de *E. oleifera* na expressão proteica de MMP-1

Neste ensaio foi avaliado a expressão das proteinases MMP-1, pelo método *Western blotting*. As células MRC-5, FPH e HaCaT foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de seis poços e tratados com o óleo-resina nas concentrações de (1,25; 2,5; 5 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas. Após o período de tratamento as células foram lisadas em 50 μL de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), acrescido de 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 0,5% (v/v) NP-40, 10% glicerol e inibidores de proteinases (coquetel de inibidores de proteases EDTA-free, da Roche; 1 mM PMSF), por 30 minutos sob agitação a 4 °C. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante recolhido e as proteínas totais dosadas utilizando o método de BRADFORD (1976). A curva de calibração foi feita com BSA (*Bovine Serum Albumin*) na concentração de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de proteína e a leitura realizada em espectrofotômetro após 10 minutos de incubação com a solução de Bradford a 595 nm. Para o *western blotting*, as proteínas dos géis foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi, Tris base (48 mM), pH 8,3; Glicina (39 mM); SDS (0,037% p/v) e metanol (20% v/v); a transferência foi realizada no aparelho semi-dry (Bio Rad), a 10 V durante 50 min. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau para visualização das bandas de proteínas e certificação de sua transferência. Em seguida, realizado o procedimento para revelação por Western Blot. Brevemente, a membrana passou por 3 lavagens, de 10 minutos

cada, com tampão TBS (Tris Buffered Saline – Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), em seguida bloqueada, durante duas horas, com 5% de leite desnatado em tampão TBST (TBS acrescido de Tween® 20 0,05% p/v). Logo após, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e incubada, overnight, com o anticorpo primário (anti-MMP-1; ABCAM em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v). A membrana foi novamente lavada com TBST e incubada, durante 1 hora, com o anticorpo secundário (anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho, 1/2500 em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v). Então, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e revelada utilizando o kit Pierce para reação de quimioluminescência. Em seguida, para detecção do padrão interno, a membrana foi submetida a “*stripping*” em tampão Tris 50 mM contendo 2% SDS, 100 mM beta-mercaptoetanol, 50°C, durante 30 minutos. Após abundante lavagem em TBST, a membrana foi rebloqueada e foram realizadas as mesmas etapas já descritas. Entretanto, o anticorpo primário foi anti- β -actina (diluição 1:1000 em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v).

4.12. Determinação da atividade hemolítica

A determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos suíços *Mus musculus* foi realizado segundo o método descrito por (JIMENEZ *et al.*, 2003), com algumas modificações. O concentrado de hemácias foi obtido pela coleta de 1 mL de sangue em tubos heparinizados, lavado por três vezes com solução salina (NaCl 0,85% +CaCl₂ 10mM) e centrifugado a (1500 rpm, por 10 minutos cada). O pellet de eritrócitos foi ressuscitado em solução salina, para preparação da suspensão de eritrócitos - 2% (SE).

O óleo-resina foi diluído nas concentrações de (15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 μ g/mL) em microplaca de 96 poços. Posteriormente, foi adicionado a cada poço uma solução de 100 μ L da (SE). A microplaca foi incubada a 37 °C durante 1 hora, sob constante agitação. A liberação de hemoglobina pelos eritrócitos foi determinada após a centrifugação a

(1500 rpm, por 10 minutos), e análise da leitura fotométrica do sobrenadante em 450 nm. Como controle positivo foi utilizado Triton 0,2% e como controle negativo DMSO.

Para a determinação da CI_{50} (Concentração que induziu 50% de hemólise dos eritrócitos), foi feita a análise da curva dose-resposta, pelo programa GraphPad Prism® (Non-linear regression, Sigmoidal dose-response).

4.13. Ensaio de genotoxicidade

O estudo do potencial genotóxico do óleo-resina de *E. oleifera* foi realizado de acordo com o método descrito por (CAVALCANTI *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 1988) com modificações. Para o ensaio, fibroblastos MRC-5 ($0,5 \times 10^5$ células/mL) foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibióticos, e incubados com o óleo-resina nas seguintes concentrações (7,5; 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$) durante 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A doxorrubicina (10 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1%) como controle negativo. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com o meio DMEM, centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos). Preparação das lâminas: As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação. Em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C, as células tratadas foram adicionadas à lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), protegida da luz a 4°C por 1 hora. Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Após esta

etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13,0). As lâminas ficaram em repouso por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA. A eletroforese (25 V; 300 mA) foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20 µg/mL). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de níveis previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina e classificados, por análise visual, em cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula. O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice de dano} = (\text{número de células no nível } 0 \times 0) + (\text{número de células no nível } 1 \times 1) + (\text{número de células no nível } 2 \times 2) + (\text{número de células no nível } 3 \times 3) + (\text{número de células no nível } 4 \times 4).$$

A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

5. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Todos os ensaios *in vitro* foram realizados pelo menos em triplicata. Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações múltiplas e a análise de variância (ANOVA) para comparação de mais de duas médias. O nível de significância a ser adotado será de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão da presente dissertação foram compilados na forma de um artigo intitulado “**Effects of the acid fraction of *Eperua oleifera* oil-resin on cell viability: an *in vitro* study of normal and malignant cell lines**”.

Effects of the acid fraction of *Eperua oleifera* oil-resin on cell viability: an *in vitro* study of normal and malignant cell lines

Gomes, F. T. A¹., Boleti, A.P.A.¹, Leandro, L.M.², Veiga-Junior, V.F.², Vasconcelos, M.A.L.¹, Aranha, E.S.P¹, Pedrosa, T. N., Lima, E.S¹.

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Amazonas Federal University, Brazil.

²Chemistry Department, Amazonas Federal University, Brazil.

ABSTRACT

The *Eperua* genus belongs to the family Fabaceae and consists of 14 species distributed from Central Amazonia. The oil-resin extracted from the trunk of *Eperua* tree has been used in popular medicine similarly to the copaiba oil (*Copaifera* ssp.) as healing, antibacterial and antifungal. Very few studies have been conducted in order to test the biological activities of the oil-resin of these species. This study aimed to investigate the effects of acid fraction of *E. oleifera* oil-resin on cell proliferation, collagen production in human fibroblasts, inhibition of metalloproteinases and cytotoxicity against tumor cell lines. After characterization, it was found the predominant presence of acidic diterpenes eperuic, kaurenoic and hardwickiic in the acid fraction of *E. oleifera* oil-resin. Results showed that the acid fraction of *E. oleifera* oil-resin caused morphology alteration, decrease of proliferation at concentrations of (≥ 5 $\mu\text{g/mL}$). The induction of collagen production in fibroblasts was significant in the treatments performed above 2.5 $\mu\text{g/mL}$. The results showed significant cytotoxicity against all lines, with IC_{50} values between (13 - 50 $\mu\text{g/mL}$) and hemolytic activity, with $\text{IC}_{50} = 38.29$ $\mu\text{g/mL}$. According to the comet assay, the oil-resin induced genotoxicity in MRC-5 cells with DNA damage index between (40 - 60 %) when compared to the negative controls (0 - 20 %). Inhibitory action of the acid fraction of *E. oleifera* oil-resin was observed in the concentration-dependent manner on collagenase activity, with $\text{IC}_{50} = 46.64$ $\mu\text{g/mL}$. The zymography assay testing the activity of MMP - 2 and MMP - 9 from HaCaT cells, showed little significant enzymatic inhibition. Western blot analysis revealed a decrease of MMP-1 expression after treatment with 5 $\mu\text{g/mL}$ in MRC-5 cells. The results show that acid fraction of *E. oleifera* oil-resin has a cytotoxic, genotoxic, hemolytic and anticollagenase potential. Taken together, our data suggests that *E. oleifera* could be considered as a source of new therapeutic drug, by isolating the active compounds and possibly decreasing the undesirable toxic side effects.

Key words: cytotoxicity, *Eperua*, metalloproteinases, collagenase

Introduction

In recent years, several studies have reported the use of medicinal plants for therapeutic purposes. Plants produce an important structural diversity of metabolites and represent the largest source of active compounds. They are used worldwide as self-prescribed home medicines, and for the pharmaceutical industry (Miller, 2011; Samwald *et al.*, 2010; Viegas and Bolzani, 2006). As bioactive compounds from plants have many biological activities, the invaluable biodiversity among Brazilian plants presents great potential in the development of new drugs for application in the treatment of human diseases (Barreiro, 2009). The identification of any possible toxicological activity in plant bioactive substances is primordial to evaluate the potential risks and certify the benefits of its uses (Newman, 2007).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteinases that are involved in the breakdown and remodelling of the extracellular matrix (ECM). It plays critical roles in cell growth, angiogenesis, invasion and metastasis of cancer cells via degradation of the MEC (Artacho-Cordon *et al.*, 2012; Hour *et al.*, 2012). Numerous studies have focused on compounds from plant species as potential inhibitors of MMPs with anti-cancer effects (Liao *et al.*, 2012; Koppikar *et al.*, 2010). MMPs are also responsible for changes in skin collagenous tissues by breakdown of collagen, a major in the ECM, especially MMP-1 (interstitial collagenase-1) (Kim *et al.*, 2005).

Plant of the genus *Eperua* are found in the Central Amazon, with 14 species described in the literature, are distributed in the setentrional and western Amazonia, from Ecuador to Guyana and Venezuela. *Eperua* trees are known to have similar properties to the genus *Copaifera*, also from Fabaceae-Caesalpinaceae family, named copaiba oil. These species produce oil-resins used for therapeutic purposes in folk medicine. Some of these *Eperua* oil-resins have similar names to the *Copaifera* species as *E. oleifera* and *E. purpurea*, known as “copaiba- jacare” and “copaibarana”, respectively (Cowan, 1978; Leandro *et al.*, 2012; Veiga

Junior and Pinto, 2002). *Eperua* oil-resin is obtained by exudation of the trunk trees, and has been traditionally used as skin healing agent, antibacterial, antifungal, as similarly copaiba oil uses, in Amazonian folk medicine (Grenand *et al.*, 1987, Gourneles *et al.*, 1986; Ducke, 1940). Chromatographic analysis of copaiba oil-resin has revealed that is comprised of sesqui- and diterpenes as the major compounds described as kaurane-, labdane- and clerodane- type diterpene. Some of the identified diterpenes, as kaurenoic and hardwickiic acids have been reported to have antitumor activity (Cavalcanti, 2006; Ohsaki *et al.*, 1994), and eperuic acid as an accelerator of collagen production (Yamamoto *et al.*, 2005). Even considering its wide use in folk medicine there are no investigations about the biology activities of the Acid fraction of *Eperua oleifera* oil-resin (AFEOR) *in vitro*.

This study aimed to investigate the effects of the acid fraction of AFEOR on cytotoxicity of normal and malignant cell lines, cytotoxicity, genotoxicity, inhibition of metalloproteinases, cell proliferation and collagen production.

Materials and methods

1. Plant Material

Samples of the *E. oleifera* oil-resin were collected in the city of Manacapuru-AM, and the plant parts were sent to the herbarium of UFAM to confirm the species.

2. Acid fraction (AFEOR) obtaining and analysis

A selective fractionation was performed in order to separate an acidic diterpenic fraction from the also apolar sesquiterpenes, all naturally present at AFEOR and observed after derivatization with diazomethane by GC-MS. The usual column chromatography is not effective to separate the sesquiterpenes from diterpenes with an acid function, that usually them retained and mix the substances on the column. So, a selective ion-exchange column chromatography fractionating was performed using silica impregnated with KOH, as

previously used to copaiba oils. After inserting the modified silica and AFEOR, the column was submitted to dichloromethane elution in order to obtain the sesquiterpenes and the non-acid components separated from the diterpenic carboxylic acids. The diterpenic acids remain retained by silica impregnated with KOH during dichloromethane elution. Sequentially, methanol was used to elute the diterpenic acids as potassium salts. The methanol fraction was concentrated under low pressure and immediately acidified with HCl until pH 4-5, dichloromethane was added and the diterpenic acids were recovered on the organic phase (dichloromethane) in a separation vessel. The solvent was evaporated in a rotaevaporator and the acid fraction (AFEOR) obtained was stored under low temperature until the analysis. After derivatization with freshly prepared diazomethane, AFEOR was analyzed by gas chromatography using flame ionization and mass spectrometry detectors. Kaurenoic, eperuic and hardwikiic acids were identified as their respective methyl esters by comparison with standarts obtained previously from copaiba oils.

3. Cell culture

Human primary fibroblasts (FPH) and human keratinocytes (HaCaT) cells, donated by Dr. Silvyta Stuchi Maria-Engler, from Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo were used. Human fibroblasts (MRC - 5) and tumor cells of melanoma (SKMEL19), human colorectal carcinoma (HCT116), breast adenocarcinoma (MCF-7), gastric carcinoma (ACP-02), ovarian adenocarcinoma (ES - 2 and NHOVCAR), were provided by human Cytogenetics laboratory of the Federal University of Para. The cells were grown in culture flasks of 75 cm², in culture medium "*Dulbecco's Modified Eagle medium*" (DMEM), high glucose, supplemented with 10% (v/v) bovine serum fetal (FBS, GIBCO), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml) and kept in an incubator at 5% CO₂ and 37 °C. After the time required reaching 70% to 80% confluence, the cells were further expanded in sterile bottles to obtain the necessary amount for the experiments. For the experiments *in vitro* after required confluence, cells were detached with a solution of 0.05% trypsin - EDTA, neutralized with the same volume of DMEM medium, centrifuged twice for 10 minutes at 1500 rpm (rotations per minute), re-suspended in the culture medium. The cell concentration was adjusted in a Neubauer chamber, with greater than 97% viability.

4. Cell viability assay

With use of Alamar Blue® method, described by (Nakayama *et al.*, 1997) cytotoxicity assays were performed for cells treated with and without AFEOR in serum-free DMEM. The cells line, MRC-5, HaCaT, FPH, MCF-7, HCT116, NHOVCAR, SKMELL19, ES-02, ACP-02 were seeded at a density of 5000 cells/well in a 96-well microtiter plate and incubated overnight. Cells were treated with and without AFEOR (at a concentration range of 0.7–50 µg/mL) in serum-containing DMEM for 24, 48 and 72 h. After incubation, the Alamar Blue solution (10 µL of 0.4% Alamar blue (resazurin) in PBS) was added and the cells were incubated for 3 h at 37 °C. Fluorescence was measured (excitation at 545 nm and emission at 595 nm) and expressed as a percentage of the cells in the control after background fluorescence was subtracted. As a positive control of cell death was used doxorubicin (5 µg/mL). The assays were performed in triplicate.

5. Morphological analysis

The overall organization of the layering of the fibroblasts from the treatment period (24 – 72 hours) was monitored using phase-contrast microscopy. The cells were viewed under phase illumination with an inverted microscope (Leica) and imaged (digital camera; Nikon). Differential morphology of cultures was observed to analyse the AFEOR treatment effects.

6. Cell counts and growth curve

Cells were seeded in a 12-well plate, with approximately 1 mL ($\sim 1 \times 10^4$) cells in each well. After 24 h, when the fibroblasts and HaCaT cells attached to the walls of the wells, the experiment began. AFEOR was dissolved in serum-free DMEM, yielding different concentrations in range of (1.25 - 5 µg/mL). In the treatment wells, these different concentrations of AFEOR were added to the wells and incubated for 24, 48 and 72 h. As control, wells were filled with DMEM and DMSO 0.5% for the same period. The wells were then rinsed with PBS and filled with culture media. Cell counts were performed in triplicate and Growth curves of the fibroblasts cells were then determined by Trypan Blue exclusion method. Cell morphology was observed by inverted microscope.

7. Cellular Studies

To study the effect of AFEOR on MMP-2 and MMP-9 inhibition, MRC-5 and HaCaT cells were seeded in a 12-well plate on reaching confluence, washed twice with phosphate-

buffered saline and then treated with or without AFEOR (1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 24 h, the conditioned media were collected, centrifuged to avoid cellular debris, mixed with 4X sample buffer containing 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, and 0.00625% Bromphenol blue, and then loaded for electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel for zymography studies.

8. Gelatin Zymography

The zymography assay (Ratnikov *et al.*, 2002) used gelatine as a substrate for MMP-2 and MMP-9. Gelatin at a concentration of 0.1% was incorporated into 10% polyacrylamide gel containing 0.4% SDS. Electrophoresis under non-reducing conditions was performed using a Bio-Rad mini-gel system at 120 V for 90 to 120 min. After electrophoresis, the gels were washed twice for 30 min in 2.5% Triton X-100 (v/v) to remove the SDS and then incubated overnight in the developing buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM ZnCl_2] at 37 °C. Digestion bands were quantitated by Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

9. Western blot analysis

MRC-5 and HaCaT cells were cultured in 6-well plates (1×10^6 cells per well) and incubated with AFEOR in concentrations of (2.5; 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 24 hours. After incubation, cells were washed with phosphate buffered saline and lysed with lysis buffer (Tris-HCl [50 mM, pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5% nonidet P-40, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 10% glycerol and proteases inhibitors (Cocktail of proteases inhibitors EDTA-free, Roche; 1 mM PMSF). After 1 hour at 40 °C, cells lysates were obtained by centrifugation at 10.000 g for 10 minutes. The total protein concentration in the lysates was measured by Bradford method, protein assay using bovine serum albumin as the standard. Samples containing equal amounts of protein concentration were separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was blocked with Tris-buffered saline with Tween 20 (1 M Tris-HCl [pH 7.5], 2.5 M NaCl, and 0.5% Tween 20) containing 5% nonfat milk for 2 hours at room temperature. The membranes were incubated overnight with the primary antibody (MMP-1 and β -actin) diluted in Tris-buffered saline with Tween 20 (1:1.000 and 1:2.000, respectively), then washed with Tris-buffered saline with Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-immunoglobulin G antibody (goat anti-rabbit

immunoglobulin G) as secondary antibody for 1 hour at room temperature. The immunoblots were visualized with chemiluminescence detection kit increased, used according to the manufacturer's recommendations (kit Pierce). Western blots are representative of three independent experiments.

10. Hemolysis test

The hemolytic activity of the AFEOR was evaluated according to (Fischer *et al.*, 2003) with modifications. Blood were collected in heparinized-tubes from Swiss mice, and centrifuged at 700 g for 10 min. The pellet was washed three times with cold PBS pH 7.4 by centrifugation at 700 g for 10 min and re-suspended in the same buffer. This suspension of red blood cells was always freshly prepared and used within 24 h after collection. Different concentrations of AFEOR, were prepared in PBS buffer, added to the erythrocytes and incubated for 60 min at 37 °C in a shaking water bath. The release of hemoglobin was determined after centrifugation (700 g for 10 min) by photometric analysis of the supernatant at 540 nm. Complete hemolysis was achieved using 0.2% Triton X-100 yielding the 100% control value. Less than 10% hemolysis was considered as non-toxic effect level in our experiments. The experiments were run in triplicate.

11. Comet assay

The Comet assay with human fibroblast (MRC-5) cells was used to detect DNA damage. Before each experiment, frosted microscope slides were pre-coated with 2 layers (100 µl) of normal agarose (1% in milli-Q water) and left at room temperature to allow agarose to dry. The cells were treated during 3 h with different concentrations of the tested samples. The cell dilution (5×10^5 cells in 60 µl) was mixed with an equal volume of low-melting point agarose (1.2% in PBS). This agarose cell suspension (120 µl) was spread onto each pre-coated slide and covered with a cover slip. After 10 min on ice, the cover slip was gently removed, and the slides were placed in a tank filled with the lysate buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% sodium sarcosinate pH 10, 1% of Triton X-100, and 10% DMSO). They were immersed for 1 h in this buffer (4 °C, in the dark). The slides were then transferred into the electrophoresis buffer (NaOH 10 N, EDTA 200 mmol/l, pH 13 in distillate water) for 20 min at room temperature in darkness. Electrophoresis was carried out for 15 min at 25 V, 300 mA. Finally, the slides were gently rinsed with neutralization solution

(0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) 3 times for 5 min each. Staining of DNA was accomplished using 50 µl of ethidium bromide solution (20 µg/ml in PBS) per slide. The slides were examined using an epifluorescence microscope (Leica).

Quantification of the comet assay: A total of 100 comets on each scored slide for each sample concentration were visually-scored according to the relative intensity of fluorescence in the tail and classified as belonging to one of five classes. We utilised three slides for each extract concentration, and the experiments were performed in triplicate. Each comet class was given a value of 0, 1, 2, 3, or 4 (from undamaged, 0 to maximally damaged, 4) as described by Cavalcanti *et al.* (2006). The total score of DNA damage was calculated by the following equation:

$$\text{Total DNA damage} = (\text{number of cells in class } 0 \times 0) + (\text{number of cells in class } 1 \times 1) + (\text{number of cells in class } 2 \times 2) + (\text{number of cells in class } 3 \times 3) + (\text{number of cells in class } 4 \times 4).$$

Statistical analysis

Results are expressed as the means and standard deviations of triplicates measurements. Each experiment was performed at least three times. Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni, Dunnett's, and Tukey post-test. A value of $p < 0.05$ indicated significance.

Results

1. Effect of *E. oleifera* oil-resin on cell viability

In order to investigate the cytotoxicity of AFEOR on human keratinocyte line (HaCaT cell), normal fibroblast FPH and MRC-5, and malignant cells line, MCF-7, HCT116, ACP-02, ES-2, SKMELL 19, NHOVCAR, the cells were seeded into wells of 96-well culture plates at a density of 0.5×10^4 cells/well. The influence of AFEOR at various concentrations on different cellular toxicity was analyzed using the Alamar Blue® assay.

Together with the increase in incubation time, we observed reduction in the cell viability after 72 h. Differences also could be noted between the concentration used (Figure 1). As shown in (Figure 1 A;B), a decrease of FPH cell viability was observed only at the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$). However, the HaCaT cells showed significant loss in viability of about 56 – 86 % observed at concentrations ≥ 25 $\mu\text{g/mL}$. After 72 h we determined more than 85% of viable cells at a concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$. Below this concentration, the cell viability did not change in comparison with control cells. Independent from the time of exposure, incubation with 3.12 $\mu\text{g/mL}$ of AFEOR, all cells were viable. As negative control, we considered cells that were not treated with AFEOR, and as positive control, the cells that were treated with doxorubicin.

The cytotoxicity effects of AFEOR on MRC-5 cell, after 72 h, is described in (Figure 1 B;E). Results showed significant loss in viability of about 40 – 80% observed at concentrations higher than 25 $\mu\text{g/mL}$, with several cell deaths at maximum concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, and IC_{50} value of ~ 25 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, below this concentration, cells were 100% viable, as well as control cells.

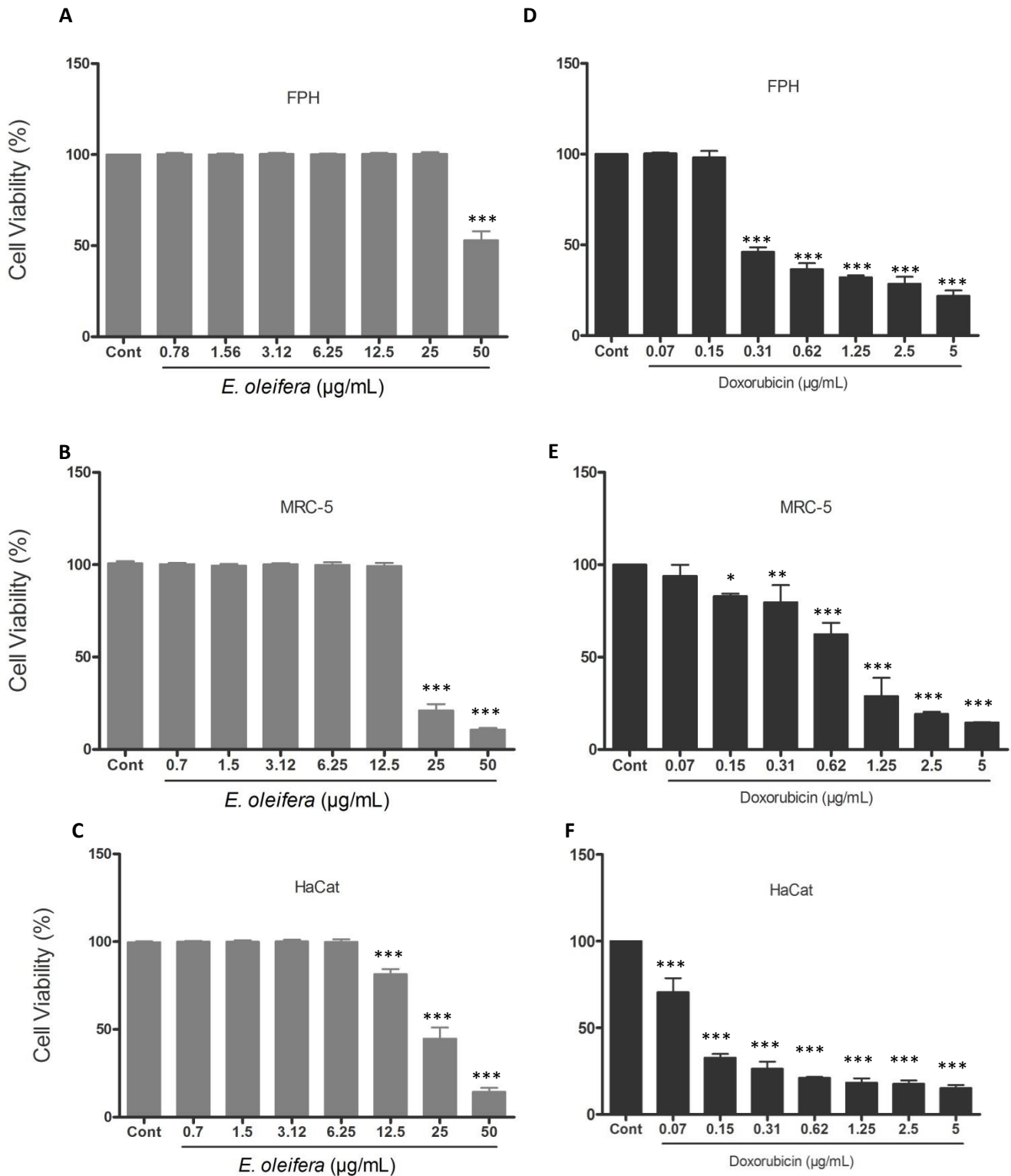


Figure 1. Cell viability using an Alamar Blue® cytotoxicity assay was performed for the cells FPH, MRC-5 and HaCat. (A),(B),(C) Treatment with AFEOR (at a concentration range of 0.7 - 50 µg/mL) in DMEM for 72 h. (D), (E), (F) Doxorubicin treatment as positive control, in a concentration range of (0.07 - 5 µg/mL). The negative control (DMSO solvent 0.1%). Each bar represents the mean ± S.D. of triplicate determinations from three independent experiments. (***) = $p < 0.001$, (**) = $p < 0.01$, (*) = $p < 0.05$ (one-way analysis of variance with Dunnett's multiple-comparison post-test).

2. Morphology of human fibroblasts and keratinocytes cells incubated with AFEOR

The morphology change was observed in a micrograph of fibroblasts MRC-5 during incubation with and without AFEOR (Figure 2). Substantial changes in cell morphology were detected microscopically with 24 h after exposure with the oil-resin, becoming more prominent after 72 h of incubation. The AFEOR at 3.12 $\mu\text{g/mL}$ showed no or little damage, when compared with control cells (Fig. 2 _{A,B}). However, up to 6.25 $\mu\text{g/mL}$ was notorious a decrease of the cell number and at higher concentrations as 50 $\mu\text{g/mL}$ it was evident the presence of cellular debris and severe changes in morphology, such as the decrease of cell density (Fig. 2 f).

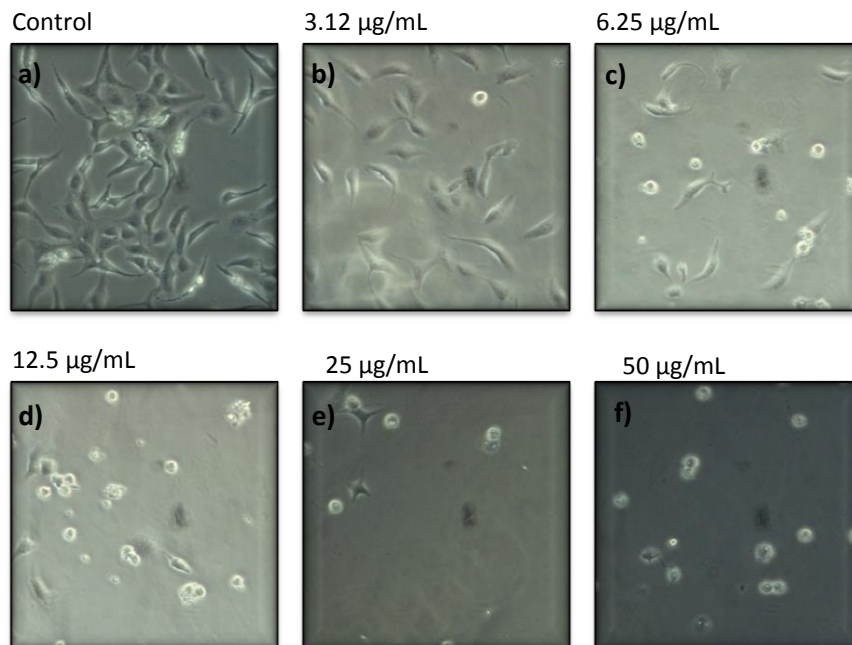


Figure 2. Representative photograph of human fibroblast morphology. The MRC-5 cells were incubated with various concentrations of AFEOR in DMEM media for 24 h. Morphological changes were observed and compared with non-treated cells. The cell culture was examined and photographed using an inverted microscope (40X).

The morphology of fibroblasts FPH and HaCaT cells was also observed during cell culture with AFEOR treatment (Figure 3 _{A-F}). There were no morphological difference between cultures with and without treatment at low concentrations (1.25 – 2.5 $\mu\text{g/mL}$) on FPH cells.

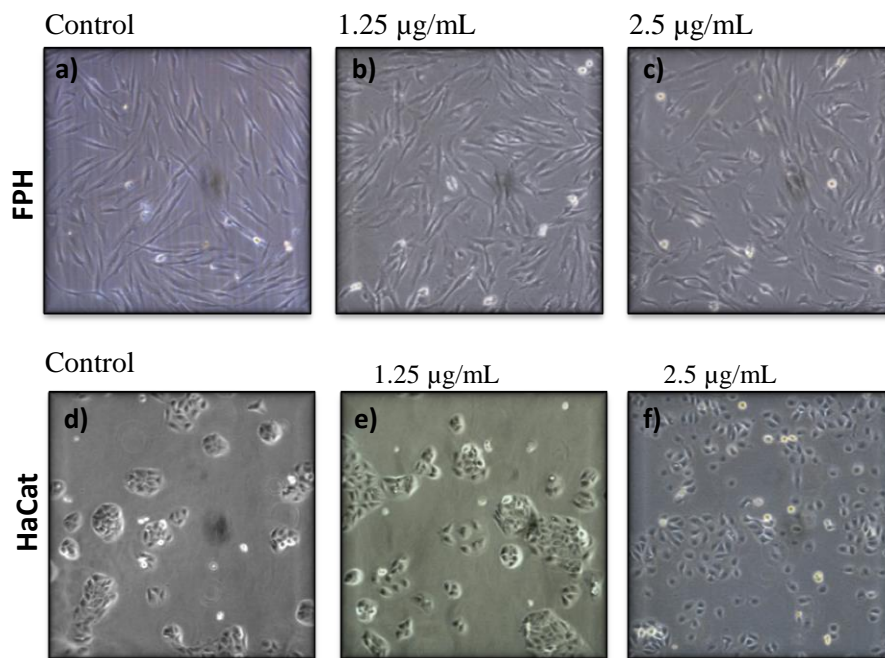


Figure 3. Representative photograph of human fibroblast and Keratinocyte morphology. The FPH (a,b,c) and HaCat (d, e, f) cells were incubated with two different concentrations of AFEOR in DMEM media for 24 h. Morphological changes were observed and compared with non-treated cells. The cell culture was examined and photographed using an inverted microscope (40X).

3. Effect of AFEOR on proliferation and synthesis of collagen of FPH and MRC-5 Cells

In this study, were evaluated the effect of AFEOR on cell growth of two different fibroblast line. It was observed that after treatment with AFEOR, FPH and MRC-5 cell proliferation (Figure 4 A-B) was decreased when cells were incubated at a concentration of 5 µg/mL. Thus, cell culture treated with AFEOR at (0.625, 1.25 or 2.5 µg/mL) did not showed inhibition of cell growth and proliferation, in comparison with non-treated cells (control).

The production of collagen by human fibroblasts (MRC-5 and FPH) cells was also investigated, using the Sirius red assay. To measure the effects of AFEOR on collagen synthesis, cells were incubated for 24, 48 and 72 h with AFEOR (Figure 4 C-D). Results of MRC-5 cells showed that collagen synthesis had a significant increase, incubated at 1.25

$\mu\text{g/mL}$ with AFEOR, after 24 h. Besides it, AFEOR treatment did not indicated significant difference of collagen production, in comparison with negative control (non-treated). Thus, on FPH cell line the collagen production was increased at about 50%, after 24 h of treatment, and at 25% after 48 h of treatment with 5 $\mu\text{g/mL}$ of AFEOR, in comparison with non-treated cells.

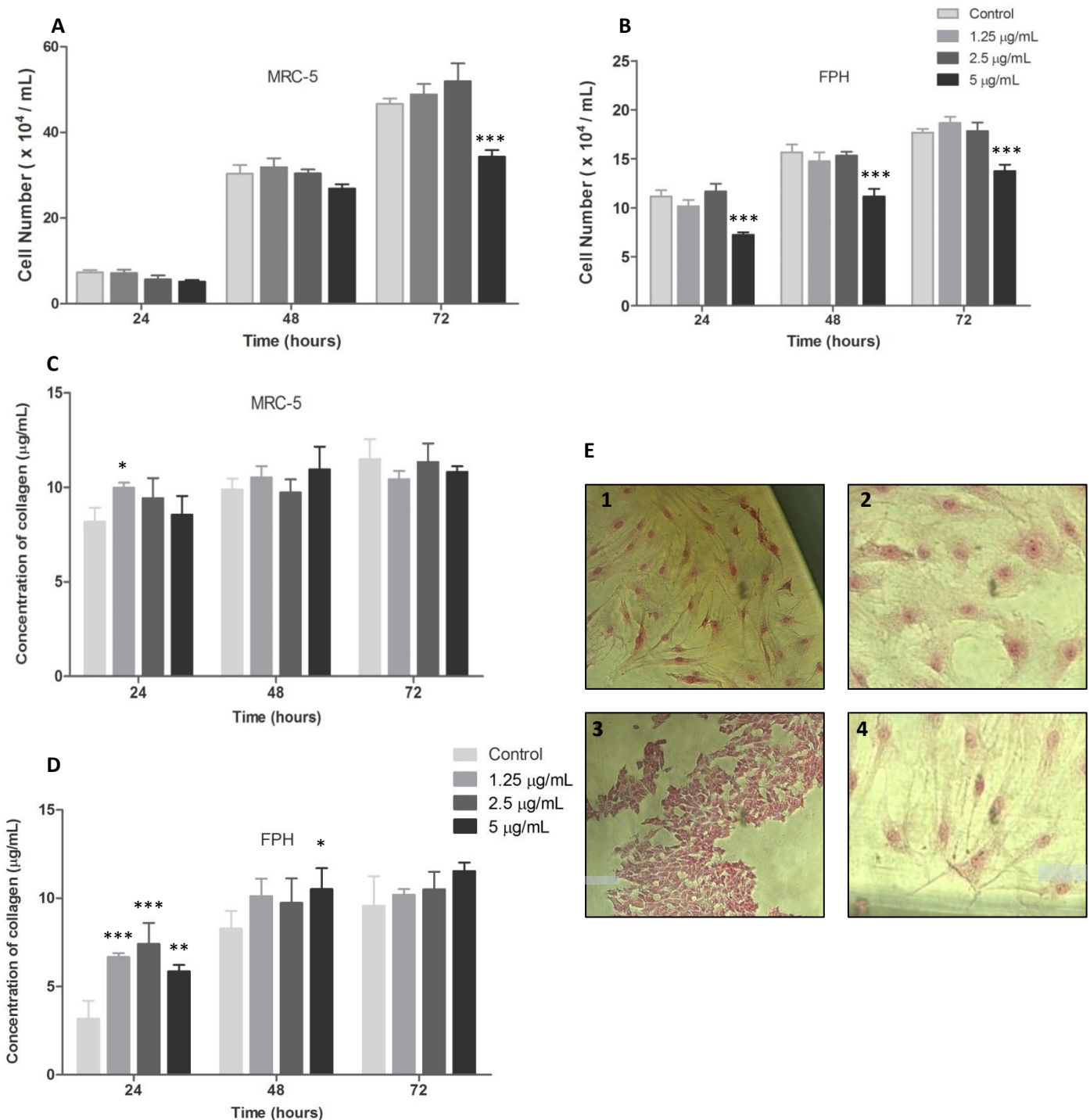


Figure 4. (A), (B) Effects of AFEOR on MRC-5 and FPH cell proliferation. Cells were treated for 24, 48 and 72 h with 0.625 – 5 $\mu\text{g/mL}$. Growth curve of fibroblasts was assessed by the Trypan blue exclusion assay. (C), (D) The analysis of collagen production of fibroblasts performed by Picosirius-Red assay. (E) The top panel shows staining of cells in culture, with a typical fibroblastic morphology treated with AFEOR, as the intensity of the staining based on the uptake of the dye in deposited collagen. (1)-(2) MRC-5, (3)-(4) FPH cells stained with sirius red and photographed under a light microscope at (40X – 100X). As negative control was used (DMSO solvent 0.1%). Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three independent experiments. (***) = $p < 0.001$, (**) = $p < 0.01$, (*) = $p < 0.05$ (Two-way ANOVA analysis, Bonferroni post-test).

4. Determination of the activity and expression of metalloproteinases

In order to determine the inhibition effects of AFEOR on collagenases activities, different concentrations of the oil-resin were incubated with 25 µg/mL of collagenase from *Clostridium histolyticum* and applied to gelatin zymography. Negative controls were performed with DMSO (0.1%). As shown in (Figure 5 A;E), treatment with AFEOR was capable of inhibiting collagenase activity in (88%) at the maximum concentration of 200 µg/mL. Below this concentration, at (3.12 – 100 µg/mL) the inhibition of collagenase activity was observed at (56 - 84%) respectively, with the IC₅₀ value of 46.64 µg/mL.

To determine if the AFEOR could inhibit the MMP-2 and MMP-9 enzymatic activities, the HaCaT and MRC-5 cells were treated with (5, 2.5 and 1.25 µg/mL) of AFEOR in serum-free medium and incubated for 24 h. Then the conditioned media of the cells were collected and their MMP-2 and MMP-9 enzymatic activities were assessed using the gelatin zymography method. As shown in (Figure 5 B, F), MMP-2 and -9 activities were detected in the conditioned media, and zymography quantitative analysis did not show significant decrease of MMP-9 activity compared with the control. In addition, there was a little decrease on MMP-2 activity from the cells treated with AFEOR.

To evaluate the effects of the AFEOR on MMP-1 protein expression, MRC-5 cells were exposed to the oil-resin treatment (1.25 - 5 µg/mL) for 24 h. Levels of MMP-1 expression were measured by western blot assay (Figure 5 C) after protein dosage of total cell lysates. AFEOR treatment showed decrease of the protein expression in a dose dependent manner, by (39%) at 1.25 µg/mL, (47%) at 2.5 µg/mL and (86%) at 5 µg/mL compared with the non-treated cell (Figure 5 D).

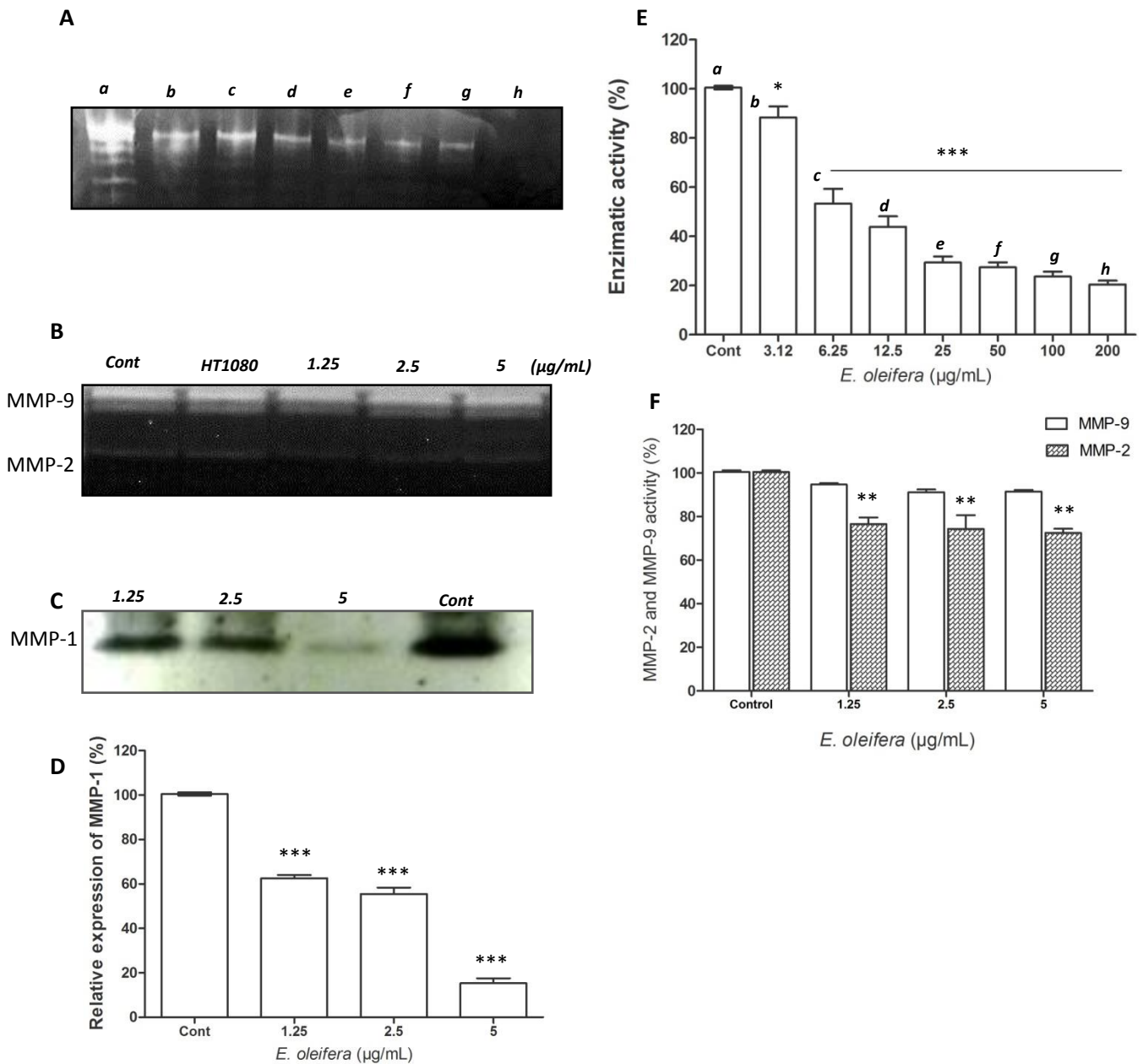


Figure 5. Effects of AFEOR on metalloproteinase activity and expression. (A) Gelatin zymography was used to evaluate the enzymatic activity of collagenases from *Clostridium Hystoliticum*, (B) MMP-2 and MMP-9 activity. The HaCat cells were cultured with 1–5 µg/mL AFEOR for 24 h, and conditioned media subjected to 10% SDS-PAGE. HT1080 cells were used as control, with no AFEOR treatment. (C) MMP-1 expression in MRC-5 cell lysates subjected to Western blot analysis with a primary antibody of MMP-1. (E) - (F) the bar graphs (means ± S.D, n = 3) represent quantitative densitometric results of at least three independent experiments. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) compared with the control (DMEM, DMSO 0.1%). Densitometric analysis was performed using ImageJ® software. Data statistics (by one-way analysis of variance with Dunnett's multiple-comparison post-test).

5. Measuring and comparing the cytotoxicity of AFEOR in a multiple malignant cell lines

We also conducted studies to determine the cytotoxicity effects of AFEOR, on malignant cell lines by using the Alamar Blue® assay (Figure 6). The cells were incubated with AFEOR in a range of (0.7 – 50 µg/mL). We observed that the treatment at maximum concentration (50 µg/mL) with AFEOR caused a severe cytotoxicity at about, 97% of HCT116, MCF-7 (91%) and SKMELL19 cells line (93%). AFEOR concentrations equal to 25 µg/mL, decreased the viability of the cells at about 90% of HCT116, MCF-7 (73%) and SKMELL19 (65%). However, nearly 12.5 µg/mL, AFEOR induced a moderate decrease on cell viability, as 36% of SKMELL19, HCT116 (14%) and MCF-7 (17%). Below this concentration, AFEOR did not influence the cell viability in comparison with non-treated cells (Fig. 6 A-C). After 72 h, cell viability was significantly reduced on the malignant cell lines, with IC₅₀ values showing significant cytotoxic effects (Table 1).

In addition, three malignant cell lines were used for this assay, ES-02, NHOVCAR and ACP-02 analysed similarly (Figure 7). Results showed that AFEOR at a 50 µg/mL, exhibited a high cytotoxic activity against the tested malignant cell lines, in comparison with the doxorubicin at a 5 µg/mL. The only exception was ACP-02, ES-2 and NHOVCAR malignant cell lines that showed more resistant toward AFEOR treatment.

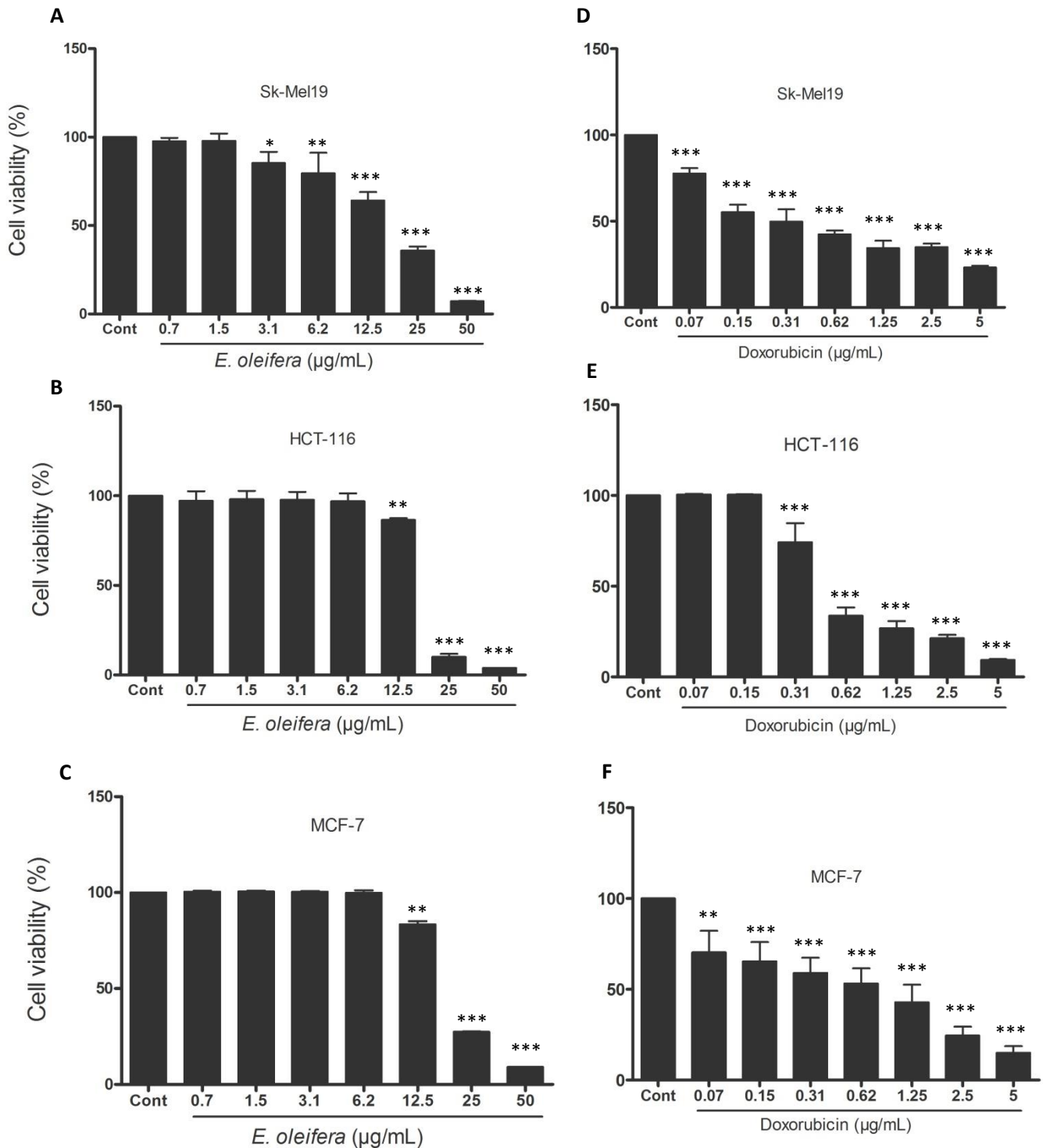


Figure 6. Cell viability using an Alamar Blue® cytotoxicity assay was performed for the malignant cells Sk-Mel19, HCT-116 and MCF-7. (A),(B),(C) Treatment with AFEOR (at a concentration range of 0.7 - 50 $\mu\text{g/mL}$) in DMEM for 72 h. (D), (E), (F) Doxorubicin treatment as positive control, in a concentration range of (0.07 – 5 $\mu\text{g/mL}$). The negative control (DMSO solvent 0.1%). Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three independent experiments. (***) = $p < 0.001$, (**) = $p < 0.01$, (*) = $p < 0.05$ (one-way analysis of variance with Dunnett's multiple-comparison post-test).

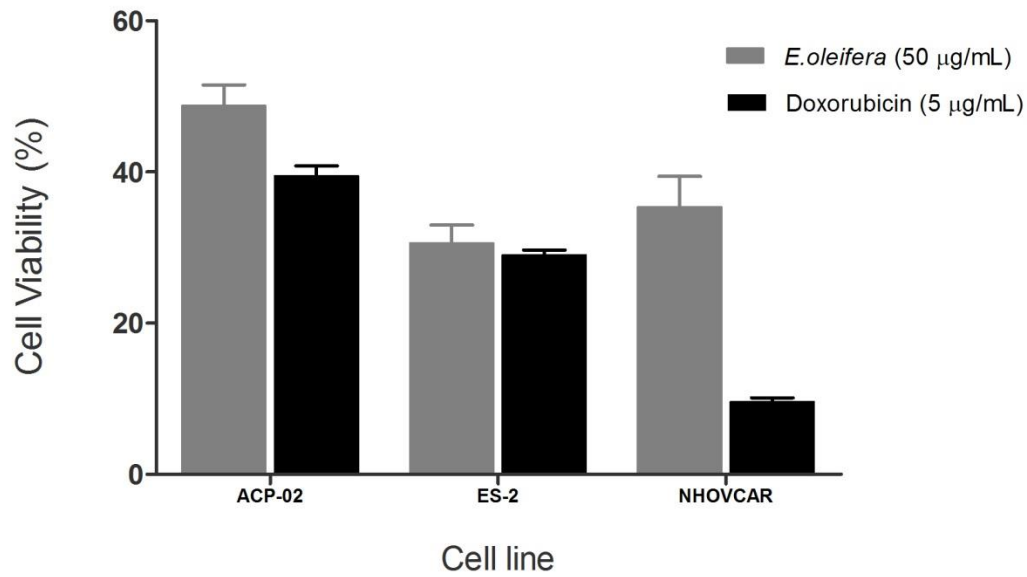


Figure 7. Cell viability of AFEOR using an Alamar Blue® cytotoxicity assay was performed for the malignant cells ACP-02, ES-2 and NHOVCAR at a unique concentration of 50 µg/mL in DMEM for 72 h. Doxorubicin treatment as positive control, in a concentration of 5 µg/mL. Each bar represents the mean ± S.D. of triplicate determinations from three independent

Table 1. Cytotoxicity results (IC₅₀ value (µg/mL))^a

Treatment ↓ Cell line	<i>E. oleifera</i>	Doxorubicin
MRC-5	14.65 (13.79 – 15.55)	3.2 (2.6 - 4.0)
FPH	> 50	2.14 (1.10 - 4.18)
HaCaT	22.92 (18.16 – 28.94)	0.58 (0.40 - 0.83)
HCT116	17.22 (14.60 – 20.30)	0.42 (0.37 – 0.78)
MCF-7	19.49 (16.95 – 22.40)	0.95 (0.73 - 1.24)
SK-Mel-19	15.99 (13.97 – 18.31)	0.779 (0.57 - 1.03)

^a Average values for IC₅₀ (µg); results are represented by the means ± SD of three experiments. Cell viability was quantified by Alamar Blue® assay as described in Materials and Methods.

6. Determination of the hemolytic activity

To evaluate *in vitro* hemolysis activity, Swiss mice erythrocytes were exposed to various concentrations of AFEOR and the release of hemoglobin was used to quantify the membrane-damaging properties. These have been screened and graded with respect to their 50% inhibitory concentration (IC_{50}) derived from the serial dilution of the concentration range (15.62 – 2000 $\mu\text{g/mL}$). As shown in (Figure 8), AFEOR showed hemolytic effects up to 62.5 $\mu\text{g/mL}$, with 64% of hemolysis indicating significant damage of the red blood cell membranes. Concentrations of AFEOR in a range of (125 - 500 $\mu\text{g/mL}$) caused (82 - 84%) of hemolysis, decreasing to (73%) at a maximum concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$. As 100 % values we used Triton X-100, and found IC_{50} values of 38.28 (29.60 – 49,50) $\mu\text{g/mL}$.

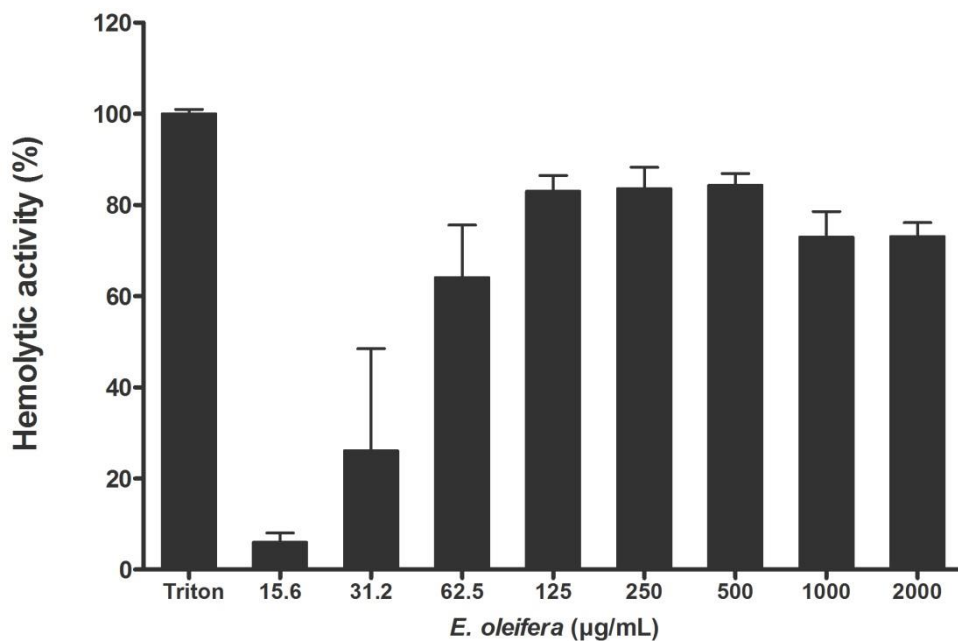


Figure 8. Hemolytic activity of *E. oleifera* oil-resin. Freshly prepared erythrocytes (from Swiss mice) were incubated with various concentrations of AFEOR and the supernatants were transferred to 96-well microplates and the absorbance was measured to quantify the extent of red blood cell lysis. Positive control (100% hemolysis) were determined by treating erythrocytes with 1% Triton X-100 (in PBS). The results are expressed as mean \pm S.D. (n=3). IC_{50} values of 38.28 (29.60 - 49.50).

7. Comet assay

The induction of DNA damage in human fibroblast MRC-5 cells after exposition to different AFEOR concentrations was investigated using the Comet assay. Data are reported as Total DNA damage in (Figure 9-A) and damage frequency (Figure 9-B). It was indicated that the oil-resin induced genotoxicity (18% - 60%) at concentrations of (7.5 - 30 $\mu\text{g/ml}$) with significant difference between the Total DNA damage of the negative control (DMSO 0.2%). The frequency of DNA damage in MRC-5 cells was described in (figure 9-B) about the different levels of tail comets extents increased by AFEOR treatment, compared with DMSO (0.1%) as a negative control and doxorubicin (10 $\mu\text{g/mL}$) as a positive control.

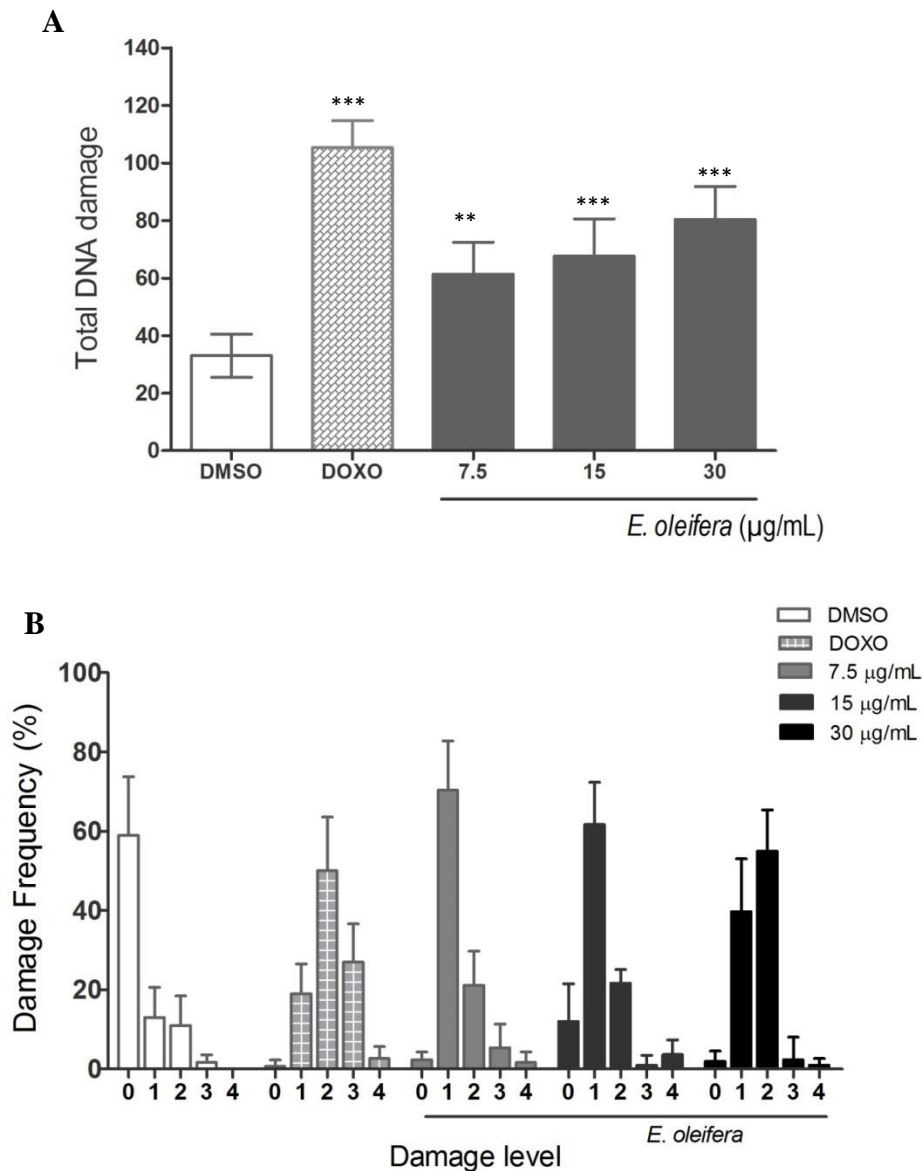


Figure 9. (A) Total and (B) frequency of DNA damage in human fibroblast MRC-5 cells, treated with *E. oleifera* for 2 hours determined by the comet assay. The vehicle used to dissolve the drug, DMSO (0.1%) was used as a negative control and doxorubicin (10 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control. Undamaged to maximal damage levels (0, 1, 2, 3 and 4). Data are mean \pm SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ compared to negative control by ANOVA followed by Tukey.

8. Discussion

In this research we have evaluated the *E. oleifera* biological effects by exploring its activity on cell viability, malignant cells cytotoxicity, cell proliferation, metalloproteinases activity, expression and collagen production. The present study is the first report demonstrating the biological activity of *E. oleifera* on human cell lines.

The chemical composition of *E. oleifera* oil-resin is a dispersion of diterpene acids in a mixture of mono- and sesquiterpenes. The main components founded in AFEOR were labdanic, clerodane and kaurane diterpenes. Some of the diterpenes reported on *Eperua* species are eperuic acid, kaurenoic acid, hardwickiic acid, most of these, presents on oil-resin of the genus *Copaifera* (Veiga Junior and Pinto, 2002). Kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oil-resin, had been reported by Costa-Lotufo *et al* (2002) for its cytotoxic and embryotoxic effects. Ohsaki *et al* (1994) described the antitumor activity of hardwickiic acid against carcinoma in Swiss mice. Copaiba oil-resin is largely used in traditional medicine for several diseases, as anti-inflammatory, antitumor, antimicrobial, wound healing, antiseptic, most of these properties, evaluated and proved by studies (Ohsaki *et al.*,1994).

It has been reported evidence of antitumor, antiinflammatory properties in certain fractions of the diterpenes, sesquiterpenes (Almeida *et al.*, 2012; Comelli Junior *et al.*, 2010; Tappin *et al.*, 2004). Paclitaxel, a known diterpene isolated from *Taxus brevifolia*, is used on cancer treatment, for solid tumours. The mechanism of action was found at the increase of microtubules stability during mitotic multiplication cellular process (Viegas, 2006; Correa, 1995). A recent study has investigated cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of copalic acid, isolated from *C. langsdorffii* (Alves, 2013).

Specifically about AFEOR, there were no available data on cytotoxicity. In this work, we reported a comparative analysis of cytotoxic effects of AFEOR with doxorubicin, a known chemotherapy drug (Finn *et al.*, 2011), on a variety of cell lines, FPH, MRC-5, HaCaT, MCF-7, HCT116, SKMELL19, NHOVCAR, ACP-02, and ES-02.

Fibroblast cells have a higher basal proliferative capacity, and its proliferation is one of the early processes during dermal wound healing, for example. Several researches on the molecular mechanisms of cellular carcinoma, has revealed that together with others factors, deregulation of proliferation plays an important role in tumorigenesis (Hanahan; Weinberg, 2000). Additionally, the normal fibroblasts derived from a primary cell culture were used together with MRC-5 fibroblasts and human keratinocytes (HaCaT), to evaluate the effects of AFEOR on MMP activity and expression, cell proliferation and production of collagen on these normal cell lines.

Morphological changes observed on fibroblast cell culture corresponded well with the cytotoxicity tests. There were visible cytotoxic effects and morphological differences between cell culture with and without AFEOR treatment ($\geq 10 \mu\text{g/mL}$). However, the significant reduction on cell viability of normal fibroblast and keratinocytes by AFEOR treatment is an undesirable result. Depending on the concentration, the non-selective cytotoxicity of AFEOR among normal and tumour cell lines could turn into an unviable or not promising product and drug.

Our experiment shows that AFEOR inhibits fibroblast cells proliferation even in low concentrations ($5 \mu\text{g/mL}$). These effects of AFEOR were not detected on cell viability assay; the decrease of cells was demonstrated only at higher concentrations ($\geq 25 \mu\text{g/mL}$). Our studies also aimed to investigate whether AFEOR increases the stimulation of collagen production in human fibroblast. Our results, although suggest that, AFEOR appears to have

some inhibitory effects on cell proliferation, the stimulatory effects on the production of collagen were significant at (5 µg/mL) that, despite a relative decrease in cell number, the concentration of collagen produced by human fibroblasts were considerable higher than non-treated cells, after 72 h of incubation time. It is a considerable result by the reason that collagen stimulation is ideal in counteracting skin aging and to improve cicatricial repair of mechanical and chemical damages (Gopinath *et al.*, 2005).

A patent application has been made for isolated compounds of *Eperua falcate* resin, relating biological activities, as accelerator of collagen production. This product comprises a mix of labd-8(17)-en-15-oic acid (eperuic acid) and labd-8-en-15-oic acid, obtained by chemically treating labdanoic acid (Yamamoto *et al.*, 2005). These findings are important, since it species of *E. oleifera* contains the same compounds. It is noteworthy that in traditional medicine, AFEOR has been noted for its use in promoting wound healing (Grenand *et al.*, 1987).

Natural products that inhibit MMPs are beneficial in the prevention and/or treatment of cancer metastasis, skin aging and wound repair (Man *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2011; Jouneau *et al.*, 2008). In this study, zymographic analysis revealed inhibition effects of AFEOR on collagenases activity. The possible mechanisms by which AFEOR inhibits the MMPs are presently unknown. Analysis of our data showed a significant inhibition by AFEOR of collagenases activity from *Clostridium histolyticum*, with IC₅₀ value of 46.64 µg/mL. Therefore, we analysed in cell culture whether AFEOR could have any direct effects on MMP-2 and MMP-9 activity, which are known to play key roles in several pathological conditions (Okada *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Fullar *et al.*, 2012; Sekiguchi *et al.*, 2012; Jouneau *et al.*, 2008). Indeed, in low concentrations (1.25 – 5 µg/mL) AFEOR weakly inhibited gelatinase activity of HaCaT cells. Unfortunately, the applicability of the AFEOR on culture cell lines at concentrations up to 10 µg/mL was unviable, because of its cytotoxicity.

Upon confirming cytotoxicity effects of AFEOR on different malignant cell lines, we also compared AFEOR effects with doxorubicin on cell viability, a known chemotherapeutic drug used for cancer treatment diseases (FINN *et al.*, 2011). AFEOR exhibited a significant cytotoxicity *in vitro* against all tested cancer cell lines, but a highest cytotoxicity ($\geq 90\%$) was observed in SKMELL19 ($CI_{50} = 15.99 \mu\text{g/mL}$), HCT116 ($CI_{50} = 17.22 \mu\text{g/mL}$) and MCF-7 ($19.49 \mu\text{g/mL}$) cell lines. Exposure to the AFEOR resulted in concentration-dependent cell deaths with a high potency when compared with doxorubicin. Besides of cytotoxicity assay with AFEOR, we described its toxicity by hemolysis test. Evaluating the hemolytic activity of AFEOR in Swiss mice erythrocytes, our results showed a high toxicity and membrane damage ($CI_{50} = 38.28 \mu\text{g/mL}$) caused by AFEOR after 30 minutes of exposure. Thus, reduction of cell viability and the significant tumour cell deaths could be explained in part, by the hemolytic activity of AFEOR (Costa-Lotufo *et al.*, 2002).

The presence of diterpenes in some plants has been reported on literature, as the cause of hemolysis induction and membrane damage of erythrocytes (Costa-Lotufo *et al.*, 2002; Aki; Yamamoto, 1991). Possibly, cytotoxic effects are mediated by interaction of AFEOR compounds with cell membranes but also by cellular uptake and subsequent activation of necrosis or apoptosis. The analysis of data suggests that AFEOR contain at least one or more compounds that alone or synergistically promote a strong cytotoxic activity against tested cell lines. Therefore, more research are need, by isolating some pharmacological effective compounds from this medicinal oil, and with the absence of cytotoxicity, could be used in the design of an effective therapeutic. As an example, synthesis of the sesquiterpene hyrtiosal from copalic acid, a characteristic diterpene of copaiba oil-resin, leaded to (-)-hyrtiosal, an isolated compound from marine organism, patent of Japanese scientist since 1992, reported as a selective cytotoxic against melanoma and leukemic cell line (Lunardi *et al.*, 2002).

This is the first report of *Eperua oleifera* oil-resin genotoxicity study. It had been reported on literature, the presence of diterpenes in *Copaifera* oil-resin with genotoxic activity (Cavalcanti *et al.*, 2006). Some studies with the oil-resin of *Eperua* have described the presence of various diterpenes found in *Copaifera* oil-resin, as kaurenoic acid, hardwickiic acid, copalic acid and eperuic acid (Leandro *et al.*, 2012; Veiga-Junior and Pinto, 2002). Cavalcanti *et al.* (2006) reported that low concentrations of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid isolated from *Copaifera langsdorffii*, did not induce DNA damage, only on higher concentrations (30 or 60 $\mu\text{g/mL}$) in V79 cells. However, *in vivo* studies with Copaiba oil-resin and its fractions by Almeida *et al.* (2012) revealed no toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of the oil even in doses of 2000 $\mu\text{g/mL}$. Gonçalves *et al.* (2011), reported in their study with nine sesquiterpenic compounds, including trans-caryophyllene, that none of the compounds showed mutagenicity. Considering that efficacy of some chemotherapeutic agents arises from its ability to generate extremely cytotoxic DNA, in this work we also evaluated genotoxicity effects of AFEOR.

The alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay was performed evaluating the extent of DNA damage detected with the increase in DNA tail of fibroblast cells. In the present study, AFEOR treatment, at a range concentration of (7.5 – 30 $\mu\text{g/mL}$), induced an increase of DNA damage in fibroblast cells between (18% and 60%) when compared with the negative control (DMSO). On the other hand, comparing with the positive control (Doxorubicin), it was observed a significantly less DNA damage. Our results indicated that the *E. oleifera* oil-resin induced genotoxicity, with ($p < 0.001$) mainly at the higher concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$.

The mechanism through which the *E. oleifera* oil-resin acts in this cellular model is unclear. The results of biological activity tests indicated that the oil-resin of *E. oleifera* could

be useful in the search for new anticancer agents, since it did present important cytotoxicity and inhibition of metalloproteinases. Further studies are needed by isolating some pharmacologically effective compounds from AFEOR, and with the absence of cytotoxicity, could be used in the development of an effective therapeutic drug. Taken together, our data also suggests that AFEOR in low concentration could be a potential agent to develop effective MMP-1 inhibitors as chemotherapeutic agents and for skin photoprotection.

Conclusion

In conclusion, our results showed that oil-resin from *E. oleifera* has cytotoxic effects on tested cancer cells, hemolytic activities and genotoxicity on fibroblast cells and exhibits significant anti-collagenase activity. Further investigations, such as screening of cytotoxic effects of the isolated compounds from AFEOR, *in vivo* studies, and research on mechanisms of action will be necessary to better understand the biological effects of *E. oleifera* oil-resin.

Acknowledgement

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) for financial support of this research. ESL is member of the INCT of Processes Redox in Biomedicina-Redoxoma (MCT/CNPq). APAB received a grant from DCR/CNPq/FAPEAM. FAT received a grant from FAPEAM.

References

- Aki, H.; Yamamoto, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. *Biochemical Pharmacology*, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.
- Almeida, M. R. *et al.* Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. *Genetics and Molecular Biology*, v. 672, p. 664–672, 2012.
- Artacho-Cordon, F. *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgery Oncology*, v. 21, p. 143-151, 2012.
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 1. ed. Ed. *Artmed*: Porto Alegre, 2001.
- Briganti, S. *et al.* Azelaic acid reduced senescence-like phenotype in photo-irradiated human dermal fibroblasts : possible implication of PPARc. *Experimental Dermatology*, n. 18, p. 41–47, 2013.
- Cao, H. *et al.* Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. *Biochemical Pharmacology*, v. 87, n. 3, p. 424–434, 2014.
- Cavalcanti, B. C. *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chemical Toxicology*, v. 44, p. 388-392, 2006.
- Comelli, J. *et al.* Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oil. *Acta Cirurgica Brasileira*, p.362-367, 2010.
- Corrêa, A. G.; Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, v. 18, p. 460-467, 1995.
- Costa-Lotufo, L. V. *et al.* A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 1, p. 47–58, ago. 2010.
- Cowan, R. S. A monograph of the genus *Eperua* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Washington: *Smithsonian Contributions to Botany*, n.28, 45p. 1975.
- Ducke, A. Notes on the wallaba trees (*Eperua* Aubl.). Yale University: School of Forestry. Tropical Woods, *New Haven*, v.62, p. 21-28, 1940.
- Finn, N. A.; Findley, H. W.; Kemp, M. L. A Switching Mechanism in Doxorubicin Bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. *PLoS Computational Biology*, v. 7, n. 9, 2011.

- Freshney, R. I. In: Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique. 5. ed. New York: Wiley-Liss, 2005. 580 p.
- Fullár, A. *et al.* Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *Experimental cell research*, v. 318, n. 13, p. 1517–27, 1 ago. 2012.
- Gonçalves, O. *et al.* Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. *Mutation Research*, v. 723, p. 18-25, 2011.
- Gopinath, D. *et al.* Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, p.1911-1917, may. 2004.
- Gournelis, D.; Vidal-Tessier, A. M.; Delaveau, P. Resin of *Eperua grandiflora* (Aublet) Benth.(Caesalpinaceae). *Annales Pharmaceutiques Francaises*, v. 43, n. 6, p. 565-572, 1986.
- Grenand, P.; Moretti, C.; Jacquemin, H. Pharnzacopées traditioiielles eil Guyane. Créoles, Palikui; Wayãpi. *Editions de l'ORSTOM*. Collection Mémoires n. 108. Paris. p. 177/261/347/393, 1987.
- Hong, M. J. *et al.* Inhibitory effect of Astragalus membranaceus root on matrix metalloproteinase-1 collagenase expression and procollagen destruction in ultraviolet B-irradiated human dermal fibroblasts by suppressing nuclear factor kappa-B activity. *Pharmacy and Pharmacology*, p. 142–148, 2013.
- Hour, M.J. *et al.* Antitumor effects of the novel quinazolinone MJ-33: Inhibition of metastasis through the MAPK, AKT, NF-kappaB and AP-1 signaling pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Institute of Journal Oncology*, v. 41, p.1513– 1519, 2012.
- Huang, S. *et al.* Zinc-Chelation Contributes to the Anti-Angiogenic Effect of Ellagic Acid on Inhibiting MMP-2 Activity, Cell Migration and Tube Formation. *PLoS One*, v. 6, n. 5, 2011.
- Hwang, Y. P. *et al.* Saponins from the roots of Platycodon grandiflorum suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF-κB/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Food and chemical toxicology*, v. 49, n. 12, p. 3374–82, dez. 2011.
- Jouneau, S. *et al.* Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in cystic fibrosis. *Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation*, p. 71–80, 2008.
- Kim, J. *et al.* Nobiletin Suppresses MMP-9 Expression through Modulation of p38 MAPK Activity in Human Dermal Fibroblasts. *The Pharmaceutical Society of Japan*, v. 37, n. 1, p. 158–163, 2014.
- Kim, J.-A. *et al.* Antiphotaging effect of chitoooligosaccharides on human dermal fibroblasts. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, v. 28, n. 6, p. 299–306, dez. 2012.

- Kim, M. S. *et al.* The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clinical Chemical Acta*, v. 362, 161–169, 2005.
- Kishimoto, Y. *et al.* Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 430, n. 2, p. 579–84, 11 jan. 2013.
- Leandro, L. M.; Veiga Junior, V. F. O gênero *Eperua* Aublet: Uma revisão. *Scientia Amazonia*, v. 1, n. 2, p. 14–22, 2012.
- Liao, Y.F.; Rao, Y. K.; Tzeng, Y.M. Aqueous extract of *Anisomeles indica* and its purified compound exerts anti-metastatic activity through inhibition of NF- κ B/AP-1-dependent MMP-9 activation in human breast cancer MCF-7 cells. *Food and chemical toxicology*, v. 50, n. 8, p. 2930–2936, ago. 2012.
- Lim, S. H. *et al.* Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90 RSK2. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 17, n. 5, p. 672–680, may 2013.
- Lunardi, I. *et al.* Synthesis of (–) - and (+) -hyrtiosal and their C-16 epimers. *Tetrahedron Letters*, v. 43, p. 3609–3611, 2002.
- Man, X.-Y. *et al.* CD109, a TGF- β co-receptor, attenuates extracellular matrix production in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis research & therapy*, v. 14, n. 3, p.144, jan. 2012.
- Miller, J. S. The Discovery of Medicines from Plants: A Current Biological. *Economic Botany*, v. 65, n. 4, p. 396–407, 2011.
- Nakayama, G. R. *et al.* Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *Journal of Immunological Methods*, n. 204, p. 205–208, 1997.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.
- Ohsaki, A. Y. *et al.* The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the olAFEOResin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* Desfon. *Medicinal Chemical Letters*, v. 4, p. 2889-2892, 1994.
- Okada, M. *et al.* Levosimendan inhibits interleukin-1 β -induced cell migration and MMP-9 secretion in rat cardiac fibroblast. *European Journal of Pharmacology*, v. 718, p. 332-339, 2013.
- Park, G. *et al.* Sauchinone, a Lignan from *Saururus chinensis*, Protects Human Skin Keratinocytes against Ultraviolet B-Induced Photoaging by Regulating the Oxidative Defense System. *The Pharmaceutical Society of Japan*, v. 36, n. 7, p. 1134–1139, 2013.

- Park, G. *et al.* Sauchinone, a Lignan from *Saururus chinensis*, Protects Human Skin Keratinocytes against Ultraviolet B-Induced Photoaging by Regulating the Oxidative Defense System. *Biological Pharmacology*, v. 36, n. 7, p. 1134-1139, 2013.
- Philips, N. *et al.* Beneficial regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, fibrillar collagens and transforming growth factor-beta by *Polypodium leucotomos*, directly or in dermal fibroblasts, ultraviolet radiated fibroblasts, and melanoma cells. *Archives of Dermatological Research*, v. 301, n. 7, p. 487-95, aug. 2009.
- Pita, João Carlos. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopiya langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae). 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Ratnikov, B. I.; Deryugina, E. I.; Strongin, A.Y. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Laboratory Investigation*, v.82, n.11, p.1583-90, 2002.
- Samwald, M. *et al.* Integrating findings of traditional medicine with modern pharmaceutical research: the potential role of linked open data. *Chinese Medicine*, v. 5, n. 1, p. 43, jan. 2010.
- Sekiguchi, Y. *et al.* Anti-proliferative effects of *Salacia reticulata* leaves hot-water extract on interleukin-1 β - activated cells derived from the synovium of rheumatoid arthritis model mice. *BMC Research Notes*, v. 198, n. 5, p. 1-6, 2012.
- Sharma, V.; Sarkar, I. N. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. *Briefings in bioinformatics*, v. 14, n. 2, p. 238-50, mar. 2013.
- Siveen, K. S.; Kuttan, G. Inhibition of B16F-10 melanoma-induced lung metastasis in C57BL/6 mice by *Aerva lanata* via induction of apoptosis. *Integrative cancer therapies*, v. 12, n. 1, p. 81-92, jan. 2013.
- Tappin, M. *et al.* Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 27, p. 236-240, 2004.
- Veiga Junior, V. F.; Pinto, A.C. O. Gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, v 25, p 273-286, 2002.
- Viegas, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- Vieira, S. A.L. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais. Dissertação (mestrado em Promoção de Saúde)- Universidade de Franca, São Paulo, 2006.

Yamaguchi, K. *et al.* Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. *Química Nova*, v. 36, n. 6, p. 826–830, 2013.

Yamamoto, T.; Yamamoto, K. Accelerator of collagen production. US 2005/0004217 A1. *United States Patent Application Publication*, Jan. 2005.

7. CONCLUSÃO

- A fração ácida do óleo-resina de *E. oleifera* apresentou elevada citotoxicidade nas linhagens celulares não tumorais de fibroblastos (MRC-5) e queratinócitos (HaCaT).
- O tratamento com a fração ácida do óleo-resina promoveu alterações morfológicas nas células MRC-5 e apresentou efeitos inibitórios na proliferação celular. Foi observado um discreto aumento na produção de colágeno de células FPH 24 horas após o tratamento.
- A fração ácida do óleo-resina inibiu a atividade gelatinolítica das collagenases. Porém, no ensaio com células HaCaT a inibição da atividade das MMP-2 e MMP-9 não foi significativa. Houve inibição da expressão proteica de MMP-1 nos tratamentos com o óleo-resina em células fibroblásticas (MRC-5).
- A fração ácida do óleo-resina foi citotóxico contra as linhagens neoplásicas testadas, com maior efetividade nas células Sk-Mel-19, HCT116 e MCF-7. Contudo, não apresentou potencial citotóxico seletivo, com valores de CI_{50} aproximados para as células neoplásicas e não-neoplásicas.
- Quando incubado com eritrócitos de camundongos *Swiss*, a fração ácida do óleo-resina de *E. oleifera* apresentou elevado potencial hemolítico. Nas células MRC-5, a fração ácida do óleo induziu efeitos genotóxicos, nas maiores concentrações.

8. REFERÊNCIAS

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.

ALBERTS, B. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, 2009.1549 p.

ALMEIDA, M. R. *et al.* Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 672, p. 664–672, 2012.

ALVES, J. *et al.* In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, doi:10.1002/jat.2777, 2012.

AMUSANT, N. *et al.* Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). **Holz Roh Werkst**, v. 65, p. 23-28, 2007.

ANDREASSI, M. *et al.* Antioxidant activity of topically applied lycopene. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, p. 52-55, 2004.

ANTIPOVA, O.; ORGEL, J. P. Non-enzymatic decomposition of collagen fibers by a biglycan antibody and a plausible mechanism for rheumatoid arthritis. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. 322- 341, jan. 2012.

APARICIO, R. M. *et al.* “In vitro” studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 1063-1067, 2005.

ARTACHO-CORDON, F. *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgery Oncology**, v. 21, p. 143-151, 2012.

ASLAM, M. N.; LANSKY, E. P.; VARANI, J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 311-318, 2006.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>. 10 p. 2003.

ÁVILA, D.; MEDINA, J. D.; DEEMING, A. J. A new clerodane-type diterpenoid from *Eperua leucantha*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 845-850, 1992.

ÁVILA, D.; MEDINA, J. D. Constituents of the seed pods of *Eperua purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1586-1589, 1993.

AZULAY, R. D. Dermatologia. 4. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.10-11. 2006.
BAE, J. Y. *et al.* (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1298–1307, abr. 2008.

BAGATIN, E. Envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmecêuticos. Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, **Boletim do Departamento de Dermatologia**, Ano V. n. 17. Jan/fev/mar. 2008.

BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of Cellular Science**, Washington, v.115, p. 3719-3727, 2002.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D.A. Drug discovery from medicinal plants. Review article. **Life Science**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARRANTES, E. GUINEA, M. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. **Life Science**, v. 72, p. 843-850, 2003.

BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A.B. Trypanosomicidal kaurenes diterpenes from *Widelia paludosa*. **Medicinal Plants**, v. 65, p. 283-284, 1999.

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **Journal of Pathology**, v.211, n.2, p.241-251, 2007.

BLAGOSKLONNY, M. V. Molecular theory of cancer. **Cancer Biology Therapy**, v. 4, n. 6, p. 621-627, 2005.

BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N. I.; AYMIM, J. S. Anti-microbial properties of some west African medicinal plants iv. Anti-microbial activity of xilopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Llyodia**, v. 40, p. 543-545, 1977.

BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Current Opinion in Cell Biology, USA: **Elsevier Science**, v.14, p.608-616, 2002.

BRASIL. Ministério da Ciência e da Tecnologia e Inovação. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. **Diário Oficial, Imprensa Nacional**, n. 129 – DOU – 05/07/12 – seção 1 – p.19.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007.

BRAZ FILHO, R. *et al.* Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1184-1186, 1973.

- BRIGANTI, S. *et al.* Azelaic acid reduced senescence-like phenotype in photo-irradiated human dermal fibroblasts : possible implication of PPARc. **Experimental Dermatology**, n. 18, p. 41–47, 2013.
- CALIXTO J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-135, 2005.
- CASTRO J. L. C, *et al.* O uso da pomada de *Calendula officinalis* no tratamento pós-operatório das deiscências de sutura de feridas cirúrgicas complicadas. Monografia. Curso de Graduação em Veterinária. Rio de Janeiro, Faculdade de Veterinária da Universidade, 2007.
- CAVALCANTI, B. C. *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388-392, 2006.
- CAVALLO, F. *et al.* The immune hallmarks of cancer. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 319–326, 2011.
- CHAKRABORTI, S. *et al.* Regulation of Matrix Metalloproteinase: an Overview. **Molecular Cell Biochemical**, v. 253, p. 269-285, 2003.
- CLARK, I. M. *et al.* The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Int. Journal of Biochemical Cell Biology**. v.40, p. 1362-1378, 2008.
- COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. Editorial / **Acta Histochemica**. v. 113, p. 231–233, 2011.
- COMELLI, J. *et al.* Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p.362-367, 2010.
- CORSI, M. M. *et al.* The therapeutic potential of *Aloe vera* in tumor-bearing rats. **International journal of tissue reactions**, **Geneva**, v. 20, p. 115-118, 1998.
- COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, ago. 2010.
- COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.
- COUSSENS, L.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v. 295, p. 2387-2392, 2002.
- COWAN, R. S. A monograph of the genus *Eperua* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Washington: **Smithsonian Contributions** to Botany, n.28, 45p. 1975.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DAVINO, S.C.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivate substituted on carbon-15. **Brazilian Journal Med. Biology Research**, v. 22, p.1127-1129, 1989.

DE SANTIS, V.; MEDINA, J. D. Crystalline racemic labda-8(20), 13-dien-15-oic acid in the trunk resin of *Eperua purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 370-372, 1981.

DeFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. Medicinal Plants of the Guianas. Disponível em:<http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Medicinal_plants_master.pdf> Acesso em: 02 abr. 2012.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: **Editora Blücher**; 2007.1186 p.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 3rd ed., John Wiley & Sons: **Chichester**, chap. 6, p. 311-420, 2009.

DITRE, C. M. *et al.* Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic and ultrastructural study. **Journal Academy Dermatology**, v. 34, p. 187-195, 1996.

DUCKE, A. As leguminosas da Amazônia Brasileira. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço Florestal. **Serviço de Publicidade Agrícola**, p. 1-9. 1939.

DUCKE, A. Notes on the wallaba trees (*Eperua* Aubl.). Yale University: School of Forestry. Tropical Woods, **New Haven**, v.62, p. 21-28, 1940.

DUKE, J. A. Aloe Research Council, USDA; Phytochemical Database.

FERREIRA, V. F. A. Fitoterapia no Mundo Atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 18- 29, 2010.

FINN, N. A.; FINDLEY, H. W.; KEMP, M. L. A Switching Mechanism in Doxorubicin Bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. **PLoS Computacional Biology**, v. 7, n. 9, 2011.

FISCHER, U. *et al.* Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. **Biomaterials**, v. 24, p. 2631–2641, 2003.

FLORA BRASIL. Lista de espécies da Flora do Brasil: Gênero *Eperua* Aubl. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://www.florabrasil.com.br>> 01.10.2013.

FISHER, G. J.; KANG, S.; VARANI, J. Mechanisms of photoaging and cronological skin aging. **Archives of Dermatology Research**, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FRESHNEY, R. I. In: Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique. 5. ed. New York: **Wiley-Liss**, 2005. 580 p.

GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, p. 303-323, 1997.

GONÇALVES, O. *et al.* Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. **Mutation Research**, v. 723, p. 18-25, 2011.

GOPINATH, D. *et al.* Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, p.1911-1917, may. 2004.

GOURNELIS, D.; VIDAL-TESSIER, A. M.; DELAVEAU, P. Resin of *Eperua grandiflora* (Aublet) Benth.(Caesalpiniaceae). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 43, n. 6, p. 565-572, 1986.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. Pharnzacopées traditionnelles eil Guyane. Créoles, Palikui; Wayãpi. **Editions de l'ORSTOM**. Collection Mémoires n. 108. Paris. p. 177/261/347/393, 1987.

GRINNEL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p.264-269, 2003.

HELGASON, C. D.; MILLER, C. L. Basic Cell Culture Protocols. 3 ed. **Humana Press**. v. 1, 2005.

HENRY, F. *et al.* Preparations containing an extract of *Eperua falcata* and/or constituents of the latter. US 2007/0003510 A1.**United States Patent Application Publication**, French, Jan. 2007.

HILLING, Celeste. HGFs como cicatrizantes naturais. **Cosmetics & Toiletries**, v.22, n.5, p. 44-47, Set/Out. 2010.

HONG, M. J. *et al.* Inhibitory effect of *Astragalus membranaceus* root on matrix metalloproteinase-1 collagenase expression and procollagen destruction in ultraviolet B-irradiated human dermal fibroblasts by suppressing nuclear factor kappa-B activity. **Pharmacy and Pharmacology**, p. 142–148, 2013.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, p. 391- 400, 2007.

HOUR, M.J. *et al.* Antitumor effects of the novel quinazolinone MJ-33: Inhibition of metastasis through the MAPK, AKT, NF-kappaB and AP-1 signaling pathways in DU145 human prostate cancer cells. **Institute of Journal Oncology**, v. 41, p.1513– 1519, 2012.

HUANG, S. *et al.* Zinc-Chelation Contributes to the Anti-Angiogenic Effect of Ellagic Acid on Inhibiting MMP-2 Activity , Cell Migration and Tube Formation. **PLoS One**, v. 6, n. 5, 2011.

HWANG, Y. P. *et al.* Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3374–3382, dez. 2011.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas do câncer para 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10/03/2014.

INOMATA, S.; MATSUNAGA, Y.; AMANO, S. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **Journal Investigation of Dermatology**, v. 120, p. 1–7, 2003.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanism Ageing Develop**, v. 123, p. 801–810, 2002.

JIMENEZ, P. C.; Fortier, S. C.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, N. E. A.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. J. **Exp. Mar. Biol. Ecol**, p. 287-293, 2003.

JONES, R. R. *et al.* The collagen stimulating effect of peptide amphiphile C16-KTTKS on human fibroblasts. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 1063–1069, 2013.

JOUNEAU, S. *et al.* Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in cystic fibrosis. **Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation**, p. 71–80, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447–455, 1979.

KANG, D. G., *et al.* **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 1345–1347, 2003.

KIM, H. H. *et al.* Photoprotective and antiskin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin *in vivo*. **Journal Lipid Research**, v. 47, p. 921–930, 2006.

KIM, H. S.; KACEW, S.; LEE, B. M. “In vitro” chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* miller, *Lentins edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1637-1640, 1999.

KIM, J. *et al.* Nobiletin Suppresses MMP-9 Expression through Modulation of p38 MAPK Activity in Human Dermal Fibroblasts. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 158–163, 2014.

KIM, J.A. *et al.* Antiphotaging effect of chitoooligosaccharides on human dermal fibroblasts. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 28, n. 6, p. 299–306, dez. 2012.

KIM, M. S. *et al.* The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin *in vivo*. **Clinical Chemical Acta**, v. 362, p. 161–169, 2005.

KING, F. E.; JONES, G. The Chemistry of extractives from hardwoods. Part XXI. The structure of Eperuic Acid. **Journal of the Chemical Society**, p. 658-665, 1955.

KISHIMOTO, Y. *et al.* Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 430, n. 2, p. 579–584, jan. 2013.

KWOK, A. H.; YUE, P. Y.; MAK, N. Ginsenoside Rb1 induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor-delta. **Biochemical Pharmacology**, n. 2010, 2012.

LEANDRO, L. *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleo- resins. **Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.

LEANDRO, L. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. O gênero *Eperua* Aublet: Uma revisão. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 2, p. 14–22, 2012.

LEANDRO, L. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Composição do óleo essencial das folhas de *Eperua glabriflora* e *Eperua duckeana* (Fabaceae). 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Sociedade Brasileira de Química**, 2002.

LEHNINGER, A. E.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M.D. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**. v. 113, p. 651–657, 2004.

LIAO, Y.F.; RAO, Y. K.; TZENG, Y.M. Aqueous extract of *Anisomeles indica* and its purified compound exerts anti-metastatic activity through inhibition of NF- κ B/AP-1-dependent MMP-9 activation in human breast cancer MCF-7 cells. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2930–2936, ago. 2012.

LIM, S. H. *et al.* Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90 RSK2. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 17, n. 5, p. 672–680, may. 2013.

LIMA, C.B. *et al.* Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl.1, p. 600-602, 2007.

LIU, C. *et al.* Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 3, p. 18–55, 2011.

LUNARDI, I. *et al.* Synthesis of (–) - and (+) -hyrtiosal and their C-16 epimers. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3609–3611, 2002.

MA, Yi-Shi. *et al.* Crude Extract of *Rheum Palmatum* L. inhibits Migration and Invasion of LS1034 Human Colon Cancer Cells Acts Through the Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 / -9 by MAPK Signaling. **Environmental Toxicology**, v. 3, p. 1–12, 2014.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MAILLO, M. A.; DE SANTIS, V.; MEDINA, J. D. Constituents of the trunk resin of *Eperua leucantha*. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 53, n. 2, p. 229- 230, 1987.

MAN, X.-Y. *et al.* CD109, a TGF- β co-receptor, attenuates extracellular matrix production in scleroderma skin fibroblasts. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 3, p.144, jan. 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-408, 2003.

MARTINS E. F. Influência da Lanolina na Cicatrização. **Saúde Revista**, Piracicaba, v.7, n.16, p.19-25, 2005.

MARTINS, I. F. B.; SILVA, A. Influência do óleo de copaíba (*copaifera* sp.) no tratamento de ferida cutânea infeccionada. **Revista Pesquisa: cuidado é Fundamental-online**, 2 (Ed. Supl.), p. 526-529, 2010.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p. 534-540, 2000.

MEHTA, R.C.; FITZPATRICK, R. E. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. **Dermatology Therapy**, v. 20, n. 5, p. 350-359, 2007.

MELO, A.C. *et al.* HPLC quantitation of kaurene diterpenes in *Xylopia* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 40-45, 2001.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-141, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série B. **Textos Básicos de Saúde Brasília** – DF, 2006.

MILLER, J. S. The Discovery of Medicines from Plants : A Current Biological. **Economic Botany**, v. 65, n. 4, p. 396–407, 2011.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaíba oil. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1653-1656, 1996.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P; CASTILHO, L. R.T : Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. São Paulo: **Rocca**, 2007. 503 p.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v.29, p. 290-308, 2008.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Chemical Biology**, v. 274, p. 21491- 21494, 1999.

NAKAYAMA, G. R. *et al.* Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, n. 204, p. 205–208, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.

NISHIGORI, C. *et al.* Photoaging and oxidative stress. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 18–21, 2003.

NISHIMORI, Y. *et al.* Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hair- less mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. **Journal Investigation of Dermatology**, v.117, p. 1458–1463, 2001.

NISHIMORI, Y. *et al.* Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hair- less mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. **Journal Investigation of Dermatology**, v. 117, p. 1458–1463, 2001.

NOLTE, S.V. *et al.* Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering. **Cells Tissues Organs**, v. 187, p.165–176, 2008.

OBAGI, Z. E. Restauração e rejuvenescimento da pele: incluindo classificação básica dos tipos de pele. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2004. 238 p.

OHSAKI, A. Y. *et al.* The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* Desfon. **Medicinal Chemical Letters**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivo Brasileiro de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

OLIVEIRA, S. T. *et al.* Formulações de confrei (*Symphytum officinale*) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agropecuária**. v.7/8, n.1, p.61-65, 2001.

OLIVEIRA, V.M. *et al.* “In vitro” screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazônica**. v. 39. n.4. p.973-980, 2009.

OMANAKUTTAN, A. *et al.* Anacardic Acid Inhibits the Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9. **Molecular Pharmacology**, v. 3, p. 614–622, 2012.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 221–233, 2007.

- PAIVA, L.A. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascular Pharmacology*, v. 39, p. 303-307, 2003.
- PALOZZA, P. *et al.* Modulation of MMP-9 Pathway by Lycopene in Macrophages and Fibroblasts Exposed to Cigarette Smoke. ***Inflammation & Allergy - Drug Targets***, v. 11, n. 1, p. 36–47, 2012.
- PARK, G. *et al.* Sauchinone, a Lignan from *Saururus chinensis*, Protects Human Skin Keratinocytes against Ultraviolet B-Induced Photoaging by Regulating the Oxidative Defense System. ***Biochemical Pharmacology***, v. 36, n. 7, p. 1134–1139, 2013.
- PAULY, G.; MORETTI, C. Plants extracts with anti-radical –type action. US 6.861.078 B2. **United States Patent Application Publication**, March. 2005.
- PAULY, G.; MORETTI, C. Plants extracts with anti-radical –type action. US 2003/0138507 A1. **United States Patent Application Publication**, July. 2003b.
- PAULY, G.; MORETTI, C. Use of plants extracts with anti-radical –type action. US 6,511,684 B1. **United States Patent Application Publication**, Jan. 2003.
- PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008. .Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2005. 283 p.
- PHILIPS, N. *et al.* Beneficial regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, fibrillar collagens and transforming growth factor-beta by *Polypodium leucotomos*, directly or in dermal fibroblasts, ultraviolet radiated fibroblasts, and melanoma cells. ***Archives of Dermatological Research***, v. 301, n. 7, p. 487–495, ago. 2009.
- PITA, João Carlos. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae). 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- RATNIKOV, B. I.; DERYUGINA, E. I.; STRONGIN, A.Y. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. ***Laboratory Investigation***, v.82, n.11, p.1583-90, 2002.
- REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. ***Journal of ethnopharmacology***, v. 68, n.1-3, p. 3-37. 1999.
- RIBEIRO, R. I. M. *et al.* Inibição de metaloproteinases por extratos aquosos de *Aloe vera*, *Annona muricata* e chá preto. ***Jornal de Biociência***, v. 26, n.1, p. 121–127, jan-fev, 2010.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Baltimore: **Williams & Wilkins**, 1997. p.131-143.
- ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. The World Medicines Situation 2011. Tradicional medicines: **Global situations, issues and challenges**. 2011.

- ROYER, M. *et al.* Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti- swelling agents. **Holzforschung**, v. 64, p. 211-215, 2010.
- RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, K. D.; PAULL, R. M. “In Vitro” Anticancer-Drug-Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p.1113-1118, 1990.
- SAKAI, S.; YAMANARI, M.; MIYAZAWA, A. “In vivo” three-dimensional birefringence analysis shows collagen differences between young and old photo-aged human skin. **Journal Investigation of Dermatology**, v.128, p. 1641–1647, 2008.
- SALAMONE, M. *et al.* Biochemical Comparison Between *Clostridium Hystoliticum* Collagenases G and H obtained by DNA Recombinant and Extractive Procedures. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 259–264, 2012.
- SAMWALD, M. *et al.* Integrating findings of traditional medicine with modern pharmaceutical research: the potential role of linked open data. **Chinese Medicine**, v. 5, n. 1, p. 43, jan. 2010.
- SANTOS, A. *et al.* Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 204–208, 2008.
- SANTOS JÚNIOR, H. M. *et al.* Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.
- SAZUKA, M. *et al.* Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 9, p. 1504-1506, 1997.
- SENEDESE, J. M. *et al.* Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1 , 2- dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- SEO, J. Y.; CHUNG, J. H. Thermal aging: a new concept of skin aging. **Journal of Dermatology Science**, v. 2, p.S13-S22, 2006.
- SHARMA, V.; SARKAR, I. N. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 238–250, mar. 2013.
- SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P.M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Rev**, v. 3, p. 701-708, 2003.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer Journal Clinical**, v. 62, p. 10–29, 2012.
- SILVERMAN, R. B. The organic chemistry of drug design and drug action. **Academic Press**, Inc.,California, 1992.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v.38, n.1, p.73-83, 2005.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biology**, v. 10, p. 415-433, 2000.

STITES, D.P.; TERR, A.I. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: **Editora Prentice –Hall do Brasil Ltda**, 1992.

STUPP, T. *et al.* Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2659-2663, 2008.

TAMAI, E. *et al.* Biologically active labdane or labdene derivatives from *Cistus*. EP 1.252.888 B1. **European Patent Specification**, April. 1999.

TAMAI, E. *et al.* Melanin inhibiting and cell growth activating compositions containing compounds having labdane structure. US 6.313.214 B1. **United States Patent Application Publication**, Nov. 2001.

TAPPIN, M. *et al.* Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, p. 236-240, 2004.

THOMPSON, C. Amazônia viva! I uma década de descobertas 1999-2009. **WWF Reports** (August/September): p. 15-17, 2010.

THRING, T. S. A; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 27, jan. 2009. VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. Revisão. v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

TRAPELLI, C.R. *et al.* Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal Pharmacology**, v. 492, p. 233-241, 2004.

VAYALIL, P.K. *et al.* Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Journal Investigation of Dermatology**, v. 122, p. 1480-1487, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 58, p. 1405–1410, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. O. Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v 25, p 273–286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. **Kluwer Academic Publishers**, 2000.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, S. A.L. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais. Dissertação (mestrado em Promoção de Saúde)- Universidade de Franca, São Paulo, 2006.

VIJAYABABU, M.R. *et al.* Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). **Molecular Cell Biochemical**, v. 287, p. 109–116, 2006.

VILLENEUVE, F.; VERGNET, A. M. Study on flavans in a tropical essential oil “*Eperua falcata* Aubl.”. **Actualites Botaniques**, v. 3, p. 19-24, 1988.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, may. 2003.

WEI, H. *et al.* The isoflavone genistein: a new agent in Dermatology. **Cosmetic Dermatology**, v. 14, p. 13-19, 2001.

WEST, M. D. The cellular and molecular biology of skin aging. **Archives of Dermatology Research**, v.130, p. 87-95, 1994.

XU, Wen-Hong. *et al.* Doxorubicin-mediated radiosensitivity in multicellular spheroids from a lung cancer cell line is enhanced by composite micelle encapsulation. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 2661–2671, 2012.

YAMAGUCHI, K. *et al.* Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 826–830, 2013.

YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, K. Accelerator of collagen production. US 2005/0004217 A1. **United States Patent Application Publication**, Jan. 2005.

YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **Journal of Cell Physiology**, v. 211, p.19-26, 2007.

