



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA**

FÁBIO CICALISE DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE TERPENOS OBTIDOS DO
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* spp. – Fabaceae)**

Orientador: Prof. Dr. Émerson Silva Lima

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

**MANAUS
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA**

FÁBIO CICALISE DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE TERPENOS OBTIDOS DO
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* spp. – Fabaceae)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do grau de doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Émerson Silva Lima

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

**MANAUS
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.

Souza, Fábio Cicalise de

S729a Avaliação do potencial farmacológico de derivados semissintéticos de terpenos obtidos do óleo de copaíba (*Copaifera* spp. - Fabaceae) / Fábio Cicalise de Souza. 2018

107 f.: 31 cm.

Orientador: Émerson Silva Lima

Coorientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior

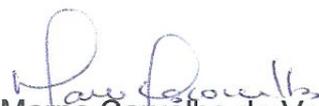
“Avaliação do potencial farmacológico de derivados semissintéticos de terpenos obtidos do óleo de copaíba (Copaifera spp. – Fabaceae)”.

DISCENTE: Fábio Cicalise de Souza

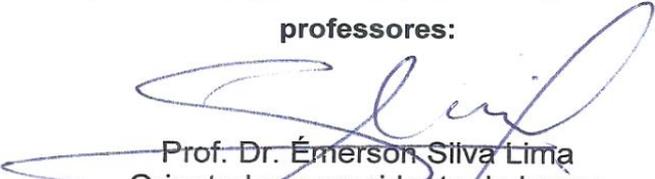
PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 17/12/2018.

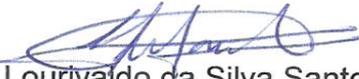

Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcellos
Coordenadora do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Orientador e presidente da banca


Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcellos
Membro interno (UFAM)


Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Membro externo (INPA)


Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
Membro externo (UFPA)


Prof^a. Dr^a. Rosany Piccolotto Carvalho
Membro interno (UFAM)

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese traz a certeza de que o infinito conhecimento nos dá a sensação de que a vida precisa estar em constante aprimoramento. A perseverança por dias melhores e o apoio de amigos em agradecimentos aqui presentes, trouxeram a possibilidade de concluir atividade tão nobre e de engrandecimento técnico e científico.

À Deus, pelas graças alcançadas até aqui, pelas inspirações que me fizeram ter paciência, perseverança e acima de tudo, gratidão, por tudo o que a vida há de proporcionar.

Aos meus pais, minhas irmãs, minhas filhas, sem dúvida, umas das mais valiosas obras que Deus me atribuiu, e que são o combustível da perseverança por dias melhores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Émerson Silva Lima, fundamental na realização desta pesquisa, com tudo o que se fez necessário. Pela paciência, pela sua capacidade em pesquisa, pelo seu apoio, pelo seu zelo, pelas suas cobranças, pelas orientações que me permitiram a condução deste trabalho da melhor forma possível, contribuindo assim, pro meu aprimoramento profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior pela oportunidade de realizar os isolamentos das substâncias no laboratório Q-biomA.

Ao laboratório Q-biomA, Leandro Lima, Larissa Sousa, Yasmin Cunha, Isadora Moita, Klenicy Yamaguchi, que me auxiliaram em fases do processo de isolamento. Ao Marcos Túlio, pela “mão na massa” no isolamento das substâncias obtidas. Aos demais, minha gratidão pela amizade e companheirismo.

Ao Rodrigo Otávio pela realização do *docking* nas moléculas semissintetizadas.

À Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplício, líder do laboratório Fitophar, pelas instalações cedidas para que a semissíntese fosse realizada.

À Dra. Ana Cristina da Silva Pinto, pelas reações de semissíntese produzidas, pelo tratamento dos dados de RMN, pelas revisões da parte química.

À Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa pela oportunidade da realização dos ensaios biológicos no laboratório “sinalização na inflamação”, a qual é líder, na Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

À Dra. Larissa Froede Brito pelo auxílio na execução dos ensaios biológicos, pela sua paciência, pela sua atenção, pelo seu carinho, pela repetição dos vários ensaios, pela sua perseverança.

À Dra. Michele Amantea Sugimoto, pelo auxílio no ensaio *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, pelo ensaio de gastrotoxicidade.

À Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida, pelo auxílio na execução do ensaio *in vivo*.

À Márcia Poinho da Encarnação de Moraes e ao Lucinei Santos Maciel, diretores do LDS (Laboratório Distrital Sul-SEMSA) pela flexibilidade de horário para que eu pudesse concluir o doutorado.

Aos Profs. Drs. Adrian Martin Pohlit, Lúcia Belém e Marne Vasconcellos pelas valiosas contribuições durante a aula de qualificação e que permitiram o aprimoramento deste manuscrito.

À banca examinadora, pelas considerações, pelo tempo disponível e pela revisão desta tese.

Enfim, a todos que participaram direta e indiretamente da execução desta pesquisa, minha gratidão.

*Ande descalço, sonhe alto,
abandone o denso, busque sua
essência, não seja escravo de
sua aparência, liberte-se desta
ilusão criada e desperte de
dentro para fora, quebre a sua
âncora e deixe a sua alma
vagar, sem pressa, navegue sem
medo do que os outros irão
achar, a jornada é somente sua.*

Vinicius Nóbrega

RESUMO

O óleo de copaíba oriundo de diversas espécies do gênero *copaifera* tem sido utilizado há muitos anos, comercialmente, em virtude de sua possível ação modulatória sobre processos inflamatórios. Estudos fitoquímicos das espécies, que elucidam sua composição química, fracionada em sesquiterpenos e diterpenos, tem sido realizados. Apesar do óleo bruto ser bastante estudado, o conhecimento do efeito de suas substâncias isoladas é escasso, e poucos são os estudos sobre modificações estruturais desses ácidos diterpênicos, buscando melhorar suas atividades biológicas. Neste sentido o presente trabalho teve como objetivos o isolamento dos ácidos diterpênicos majoritários presentes no óleo de *Copaifera multijuga*: ácidos copálico e 3-hidróxi-copálico e *Copaifera reticulata*: ácido hardwíckiico, realizando-se modificações estruturais nos 2 (dois) primeiros, por reações químicas de baixo custo e otimizadas, bem como ensaios *in vitro* e *in vivo* da substância com melhor *screening* anti-inflamatório e posteriormente estudo *in silico*. Após o isolamento, as substâncias foram semissintetizadas e suas estruturas elucidadas por análise de RMN ^1H e ^{13}C , e por conseguinte, testadas em ensaio de viabilidade celular e teste de verificação da atividade de inibição do TNF- α *in vitro*. O modelo *in vivo* de pleurisia/pleurite em camundongos *balb-c* foi realizado com a substância de melhor *screening* anti-inflamatório (ACD13B-esterificação do *ibuprofeno* com o ácido 3-hidróxi-copálico), assim como ensaio de expressão da proteína IKB- α . Além disso, o ensaio de gastrotoxicidade também foi procedido com a mesma substância. Os derivados semissintetizados foram: ACD4-epoxidação do ácido copálico, ACD13B-esterificação do *ibuprofeno* com o ácido 3-hidróxi-copálico e ACD51-acilação do *anidrido ftálico* com o ácido 3-hidróxi-copálico. O ACD13B não apresentou potencial citotóxico na linhagem THP-1 quando testado na concentração de 2 μM . As demais substâncias não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Além disso, o ACD13B inibiu significativamente a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS. Em animais com pleurisia induzida o ACD13B reduziu em torno de 40% o total de leucócitos e em até 50% o número de mononucleares na dose de 100 mg/Kg por via *intra-peritoneal* (IP). Houve também inibição da pIKB- α . O ACD13B apresentou menor efeito gastrotóxico quando comparado ao *ibuprofeno* em camundongos. O estudo de *docking* revelou a afinidade e o modo de interação da substância ACD13B em COX-2 e COX-1, identificando interações hidrofóbicas e hidrofílicas. Os resultados obtidos indicam que o derivado do *ibuprofeno* com o ácido 3-hidróxi copálico apresenta-se como um protótipo de fármaco anti-inflamatório com menor efeito gastrotóxico que o *ibuprofeno*, o qual pode ser futuramente explorado quanto a outras propriedades funcionais e terapêuticas.

Palavras-chave: Copaíba (*Copaifera* L.), diterpenos, *docking*, modificação estrutural, anti-inflamatório, derivados, *ibuprofeno*, pleurisia.

ABSTRACT

Copaiba oil from several species of the genus *Copaifera* has been used for many years, commercially, because of its possible modulatory action on inflammatory processes. Phytochemical studies of the species, which elucidate their chemical composition, fractionated in sesquiterpenes and diterpenes, have been performed. Although crude oil is well studied, it is scarce to know the effect of its isolated substances, and there are few studies on the structural modifications of these diterpene acids, seeking to improve their biological activities. In this sense, the present work had as objectives the isolation of the majority diterpenic acids present in the *Copaifera multijuga* oil: copalic and 3-hydroxy-copalic acids and *Copaifera reticulata*: hardwickiic acid, with structural modifications in the 2 (two) low-cost and optimized chemistries, as well as *in vitro* and *in vivo* assays of the substance with the best anti-inflammatory *screening* and subsequent *in silico* studies. After isolation, the substances were semi-synthesized and their structures elucidated by ^1H and ^{13}C NMR analysis, and therefore, tested in cell viability assay and TNF- α inhibition activity check test *in vitro*. The *in vivo* model of pleurisy/pleuritis in *balb-c* mice was performed with the best anti-inflammatory substance (ACD13B-esterification of ibuprofen with 3-hydroxy-copalic acid), as well as expression assay of I κ B- α protein. In addition, the gastrointestinal test was also performed with the same substance. The semi-synthesized derivatives were: ACD4-epoxidation of copalic acid, ACD13B-esterification of ibuprofen with 3-hydroxy-copalic acid and ACD51-acylation of phthalic anhydride with 3-hydroxy-copalic acid. ACD13B showed no cytotoxic potential in the THP-1 line when tested at the concentration of 2 μM . The other substances did not present significant cytotoxicity at concentrations tested. In addition, ACD13B significantly inhibited TNF- α production in LPS-stimulated THP-1 cells. In animals with induced pleurisy, ACD13B reduced the total number of leukocytes by 40% and the number of mononuclear cells at a dose of 100 mg/kg intraperitoneally (IP) by up to 50%. There was also inhibition of pI κ B- α . ACD13B presented a lower gastrointestinal effect when compared to ibuprofen in mice. The *docking* study revealed the affinity and mode of interaction of the substance ACD13B in COX-2 and COX-1, identifying hydrophobic and hydrophilic interactions. The results indicate that the ibuprofen derivative with 3-hydroxy copalic acid is a prototype of an anti-inflammatory drug with a lower gastrointestinal effect than ibuprofen, which may be explored in the future for other functional and therapeutic properties.

Key words: Copaiba (*Copaifera* L.), diterpenes, docking, structural modification, anti-inflammatory, derivatives, ibuprofen, pleurisy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias majoritárias dos óleos de copaíba.	24
Figura 2: Esqueletos dos ácidos diterpênicos dos óleos de copaíba.....	26
Figura 3: Principais ácidos diterpênicos do óleo-resina de copaíba.....	29
Figura 4: Novos diterpenos obtidos de <i>Salvia amaríssima</i>	30
Figura 5: Esqueleto de diterpeno <i>cassano</i>	31
Figura 6: Diterpenos e seus derivados encontrados no óleo-resina de copaíba.	31
Figura 7: Fluxograma de execução de ações.	37
Figura 8: Esquema de realização de coluna aberta (VARGAS, 2013).	41
Figura 9: Esquema de modificação estrutural do ácido copálico.	42
Figura 10: Esquema da reação de epoxidação do ácido copálico.	42
Figura 11: Esquema de modificações estruturais do ácido 3-hidróxi-copálico (02 reações).	43
Figura 12: Esquema da reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno.	44
Figura 13: Esquema da reação de reação de acilação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico.	45
Figura 14: <i>MS-APCI</i> do ácido copálico, modo negativo (PM: 303,37).	56
Figura 15: Espectro de RMN de ¹ H do ácido copálico (CDCl ₃ ; 500MHz).	57
Figura 16: <i>MS-APCI</i> do ácido 3-hidróxi-copálico, modo negativo (PM: 319,34).	59
Figura 17: Espectro de RMN de ¹ H do ácido 3-hidróxi-copálico (CDCl ₃ ; 500MHz).	59
Figura 18: <i>MS-APCI</i> do ácido hardwíckiico, modo negativo (PM: 315,32).	62
Figura 19: Espectro de RMN de ¹ H do ácido hardwíckiico (CDCl ₃ ; 500MHz).	62
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H do ibuprofeno (CDCl ₃ ; 500MHz).	65
Figura 21: Esquema de reações produzidas cujas análises de <i>MS</i> e RMN ¹ H e ¹³ C.	67
Figura 22: <i>MS-APCI</i> do derivado epóxido do ácido copálico (ACD4), modo negativo (PM:319,36).	68
Figura 23: Espectro de RMN de ¹ H da reação de epoxidação do ácido copálico (CDCl ₃ ; 500MHz).	68
Figura 24: <i>MS-APCI</i> do derivado esterificado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B, ácido 3-ibuprofenato-copálico), modo negativo (PM: 507,52).	71
Figura 25: Espectro de RMN de ¹ H da reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (CDCl ₃ ; 500 MHz).	71
Figura 26: <i>MS-APCI</i> do derivado do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico (ACD51), modo negativo (PM: 467,41).	74
Figura 27: Espectro de RMN de ¹ H da reação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico. (CD ₃ OD; 500 MHz).	74
Figura 28: Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e pré-tratamento com os bioativos em diferentes concentrações (2, 10 e 20 μM).	78
Figura 29: Inibição do TNF-α em células THP-1 ativadas com LPS e tratadas com ACD13B (derivado esterificado do ácido 3-hidroxi-copálico com ibuprofeno) na concentração 2 μM.	81
Figura 30: Efeito do ACD13B em modelo de pleurisia induzida por LPS.	83
Figura 31: Efeito do derivado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B) e ácido 3-hidróxi-copálico (3-ACOP) sobre a expressão molécula-chave da via de sinalização da inflamação (p-ικBα) no ensaio dose-resposta em células THP-1 ativadas com LPS.	85
Figura 32: Fotomicrografias (aumento de 10x) (A) Grupo tratado com o ibuprofeno 4h, (B) Grupo tratado com ACD13B 4h. Tecidos de estômago de camundongos.	87
Figura 33: Efeito do derivado éster ACD13B (300 mg/Kg) em comparação com o IBUP (ibuprofeno-300 mg/Kg) no modelo de gastrotoxicidade em camundongos balb-C.	88
Figura 34: (A) Estudo de modelagem molecular gerada em COX-2 (PDB: 4PH9) para ACD13B.	90
Figura 35: (A) Estudo de modelagem molecular gerada em COX-1 (PDB:1EQG) para ACD13B.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ácidos diterpênicos e suas atividades biológicas.	32
Tabela 2: Substâncias da reação precedente.	44
Tabela 3: Substâncias da reação precedente.	45
Tabela 4: Rendimento das substâncias semissintetizadas.	55
Tabela 5: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ácido copálico.	58
Tabela 6: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ácido 3-hidróxi-copálico.	61
Tabela 7: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ácido hardwíckiico.	64
Tabela 8: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ibuprofeno.	66
Tabela 9: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do epóxido do ácido copálico (ACD4).	70
Tabela 10: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C da reação de esterificação do ác. 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B).	73
Tabela 11: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C da reação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico.	76
Tabela 12: Fórmula geral e peso molecular dos derivados semissintéticos.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
AMH	Ágar Mueller-Hinton
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
ALA	Alanina
APCI	<i>Athmosphere pressure chemical ionization</i>
ARG	Arginina
ASP	<i>Ácido aspártico</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BOG	Beta-octilglucosídeo
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDp	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectômetro de massa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTA	Conhecimento Tradicional Associado
CTI	Cromatografia de troca iônica
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
COX	Ciclooxigenases
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	Dimetil-sufóxido
DMEM	<i>Dilbecco modified eagle médium</i>
EDO	Etanoldieno
EM/MS	Espectrometria de massa/mass spectrometry
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
GLY	Glicina
HCT-116	Células carcinoma colorretal
Hex	Hexano
HIS	Histidina
IKK	IKB quinase, uma enzima.
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MET	Metionina
MTT	Brometo de dimetiltiazol dimetiltetrazólio
MCF-7	Céluls adenocarcinoma de mama
MESA-DX	Sarcoma uterino resistente a doxorubicina
PBS	Phosphate buffered saline
PHE	Fenilalanina
PMA	Forbol miristato
RPM	Rotações por minuto
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SAB	Ágar Sabourad
SER	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SK.MELL	Células melanoma humano
THP-1	Human monocytic cell line
THR	Treonina
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TODD	Meio de cultura para Streptococcus
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VAL	Valina

SUMÁRIO

RESUMO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 Plantas Medicinais	21
3.2 Copaíba	22
3.3 Estudos fitoquímicos do óleo-resina	23
3.4 Atividade biológica do óleo de copaíba	24
3.5 Ácidos diterpênicos	26
3.6 Atividade biológica dos ácidos diterpênicos	28
3.7 Semissíntese de ácidos diterpênicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Modelo de Estudo	37
4.2 Obtenção de amostras	38
4.4 Fracionamento, isolamento, purificação e análise de substâncias	39
4.5 Cromatografia em camada delgada	39
4.6 Cromatografia com sílica impregnada com KOH	39
4.7 Cromatografia em coluna aberta	41
4.8 Cromatografia em coluna fechada e sob pressão (“Flash”)	41
4.9 Modificação estrutural do ácido copálico:	42
4.9.1 Semissíntese do derivado epóxido do ácido copálico – ACD4- (Reação de epoxidação)	42
4.9.2 Semissíntese: reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno– ACD13B	44
4.9.3 Semissíntese: reação de acilação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico – ACD 51	45

4.4	Caracterização química.....	46
4.5	Estudos das atividades farmacológicas.....	47
4.5.2	Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e tratamento com bioativos em diferentes concentrações	48
4.5.3	Quantificação de TNF α nos sobrenadantes celulares.....	49
4.7	Animais.....	50
4.7.1	Modelo murino de pleurisma/pleurisia induzida por LPS.....	50
4.7.2	Contagem total e diferencial de células	50
4.9	Softwares utilizados	52
4.10	Análise estatística.....	53
5.	Resultados e Discussão.....	54
5.4	Atividades farmacológicas:.....	78
5.4.1	Efeito dos bioativos semissintetizados sobre a viabilidade de células THP-1	78
5.4.2	Efeito de bioativos semissintetizados na produção de TNF- α em células THP-1 ativadas por LPS.....	80
6.	CONCLUSÕES	93
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Copaifera* L. pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília *Caesalpinioideae*. O gênero possui 72 espécies, das quais 16 são endêmicas do Brasil, principalmente nos biomas amazônico e cerrado (VEIGA-JR & PINTO, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2004). O óleo de copaíba está em um intenso processo de inserção no mercado devido às suas propriedades terapêuticas como anti-inflamatório, emoliente, bactericida, antimelasma. A extração do óleo-resina de copaíba já vem sendo realizada com recursos de manejo sustentável por comunidades do Acre desde o ano de 1999 (SCUDELLER, *et al.*, 2007).

Popularmente conhecidas como copaibeiras ou “pau d’óleo”, as copaíbas são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. - encontrada no norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e na capital San Salvador; *C. guianensis* Desf. - frequente nas Guianas; *C. reticulata* Ducke e *C. multijuga* Hayne - endêmicas na Amazônia; *C. confertiflora* - encontrada no Piauí; *C. langsdorfii* Desf. - distribuída por todo território brasileiro e encontrada também na Argentina e Paraguai; *C. coriacea* Mart. - encontrada na Bahia; *C. cearensis* Huber ex Ducke - encontradas no Ceará (VEIGA-JR & PINTO, 2002).

Muitas doenças inflamatórias agudas ou crônicas, tais como: artrite, inflamações intestinais e asma podem ocorrer e os tratamentos disponíveis envolvem a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), especialmente os da classe “coxibs” que tem sido largamente utilizados no tratamento de processos inflamatórios agudos e crônicos, portanto, com muitos efeitos colaterais e adversos. Neste sentido, as ações terapêuticas do óleo de copaíba, tais como suas propriedades bactericidas, anti-inflamatórias, antitumorais, torna-se uma alternativa eficaz, já que a inflamação é regulada por muitos mediadores como o óxido

nítrico (NO), a prostaglandina E^2 (PGE^2), o $NF-\kappa\beta$ (RAINSFORD, 2005). Além disso, substâncias presentes no óleo de copaíba, assim como seus derivados semissintéticos, agem efetivamente nos mediadores, reduzindo o processo inflamatório (RAINSFORD, 2005).

Em outros estudos, observa-se que o ácido caurenóico é um diterpenóide com uma das mais importantes atividades biológicas, obtido de *copaifera* spp., que exerce ação anti-tumor (CAVALCANTI *et al.*, 2006), vasodilatadora (AMBROSIO *et al.*, 2004) e antibacteriana (GIL, *et al.*, 2006). Ainda, o ácido caurenóico tem sido reportado com efeito analgésico (OKUYAMA *et al.*, 1991). Tem sido relatado que alguns compostos diterpênicos do tipo caurano tem causado efeitos inibitórios na ação da tirosina fosfatase 1B (NA *et al.*, 2006), e colinesterase (ERTAS *et al.*, 2007), bem como atividade anti-HIV (WU *et al.*, 1996). Na pesquisa realizada por Vargas (2013), estudos preliminares comprovam a atividade anti-inflamatória através da inibição da produção de óxido nítrico (NO), onde o ácido copálico e o ácido hardwíckiico tiveram atividade equivalente ao padrão indometacina. Os compostos também inibiram a produção de $TNF-\alpha$. Os ácidos caurenóico e o copálico inibiram a produção de IL-6. Com isso, esses diterpenos podem ser considerados componentes responsáveis por contribuir no combate ao processo inflamatório.

Estudos de modificação estrutural obtidos em ácidos diterpênicos de reconhecida importância em mecanismos de inflamação, mais precisamente ácido caurenóico, copálico e seus derivados, hardwíckiico entre outros, tem sido produzidos recentemente com a finalidade de se elaborar produtos finais modificados com atividade anti-inflamatória mais potente e redução de efeitos colaterais, fazendo com que seja possível lançá-los no mercado farmacêutico futuro, agregando valor em saúde pública. Reações de esterificação e acilação realizam inserção de grupamentos funcionais que tornam as moléculas mais estáveis facilitando sua permeabilidade nas membranas celulares, constituindo excelente método para

o desenvolvimento de fármacos com melhora de sua atividade biológica (BUTLER, 2008; NEWMAN & CRAGG, 2012; MATOS *et al.*, 2015; PANTAROTTO, 1996; PEDRIALI, *et al.*, 2008; CHEN, *et al.*, 2011; THEODULOZ *et al.*, 2015).

Considerando os poucos estudos com o óleo de copaíba que descrevem sua composição química, bem como seus componentes químicos (ácido copálico e seus derivados), seus efeitos biológicos que são responsáveis por atividades biológicas (VARGAS, 2013), torna-se indispensável a utilização de técnicas laboratoriais mais específicas para o esclarecimento de questionamentos que dizem respeito, principalmente, aos mecanismos de ação e comprovação de suas atividades biológicas (FERNANDES & FREITAS, 2007; CURIO *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2011; GELMINI *et al.*, 2013).

Atualmente, as pesquisas que atuam no desenvolvimento de fármacos onde os ligantes de proteínas desempenham um papel importante na previsão da orientação do ligante para um receptor ou enzima, estudos de modelagem molecular ou *in silico*, são indispensáveis no desenvolvimento de drogas, uma vez que os procedimentos de encaixe podem ser melhorados em vários grupos químicos, permitindo a flexibilidade do receptor e do ligante (PAGADALA *et al.*, 2017). No caso de inibidores não seletivos da COX-2, faz-se necessário esclarecer as relações de afinidade das COXs após modificações químicas. (SHRIVASTAVA *et al.*, 2017).

Neste sentido e com a finalidade de responder a indagações ainda não elucidadas, e em virtude dos escassos estudos com as substâncias presentes no óleo de copaíba, especialmente dos ácidos diterpênicos, torna-se imperiosa a realização de novas metodologias para melhor avaliação farmacológica de substâncias modificadas isoladas procedentes do óleo de copaíba. Os ácidos copálico, ácido 3-hidróxi-copálico foram escolhidos por suas atividades anti-inflamatórias consideráveis como sendo, os dois primeiros ácidos diterpênicos citados no início deste parágrafo, de acordo com pesquisa realizada por Vargas (2013).

Dessa forma, a presente pesquisa iniciou-se pelo reisolamento dos ácidos diterpênicos com elaboração de um roteiro para reações de modificação estrutural nos supracitados ácidos, objetivando inserção de grupamentos funcionais que aumentassem a estabilidade da molécula, melhorando a lipossolubilidade e melhorando a permeabilidade dos mesmos às membranas celulares (ESPINOZA-HICKS, CAMACHO-DÁVILA, & NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2011). Assim, foram estudados o potencial anti-inflamatório permitindo avaliação farmacológica das substâncias derivadas produzidas. Modelos *in vitro* de inflamação, assim como modelo *in vivo* de pleurite/pleurisia e método *in silico*, foram métodos importantes na avaliação farmacológica dos referidos derivados. Tais informações farmacológicas agregam valor comercial ao óleo de copaíba confirmando seus usos populares, tendo no futuro, a possibilidade de produção de novos derivados a partir de modificações estruturais utilizando-se reações químicas de procedimento rápido e baixo custo.

2. OBJETIVOS

Geral

Identificar o potencial farmacológico de derivados semissintéticos preparados a partir de substâncias isoladas do óleo-resina de copaíba.

Específicos

- Isolar diterpenos a partir dos óleos de *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata* por métodos cromatográficos em escala de gramas;
- Sintetizar e elucidar estruturalmente derivados desses ácidos a partir de reações químicas simples, visando aumento da atividade biológica;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório, *in vitro*, dos derivados semissintéticos em modelos celulares;
- Avaliar o melhor potencial anti-inflamatório em modelos *in vivo* das moléculas mais promissoras nos testes *in vitro*.
- Estudar por modelagem molecular as interações entre COX-2 e COX-1 do derivado mais ativo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais tem sido terapia alternativa para tratar inúmeras doenças, constituindo prática comum há milhares de anos antes de Cristo. A busca por compostos ativos em plantas só começou no século XIX quando Friedrich Serturmer, em 1806, isolou um alcalóide da morfina obtido da *papoula* (*Papaver somniferum*). Com isso, atualmente muitas plantas são utilizadas como fonte de novas substâncias ativas e novas drogas de interesse farmacêutico tendo a etnobotânica e etnofarmacologia como as primeiras abordagens para selecionar fármacos bastante promissores (VEIGA-JR & PINTO, 2002).

O Brasil, contém uma das maiores biodiversidades do planeta, englobando em torno de 20% das espécies do mundo, estimando-se em números de 350.000 à 550.000 exemplares que fazem parte da flora medicinal e dentre estas, 55.000 estão catalogadas e distribuídas nas diversas regiões do país fazendo parte muitas vezes, das únicas opções terapêuticas em determinadas regiões onde constantemente se busca novos medicamentos seguindo-se práticas tradicionais (RIBEIRO *et al.*, 2014).

No território brasileiro, o estudo de plantas medicinais se torna de suma importância para que possamos introduzir na terapêutica, produtos de origem vegetal, pois a maior parte de nossa matéria prima, em torno de 90%, vem de outros países e cerca de 80% do povo brasileiro não tem acesso a medicamentos e serviços de saúde (VEIGA-JR *et al.*, 2005). A flora brasileira proporciona à população de baixa renda o medicamento mais barato e algumas vezes de qualidade garantida (MACIEL *et al.*, 2002).

A procura por novas substâncias para uso farmacêutico em plantas do Brasil se faz a esperança mais plausível para o tratamento de doentes e o caminho de maior disponibilidade

para os pesquisadores, mesmo assim, constituindo-se desafio constante na descoberta das substâncias ativas e seus mecanismos de ação, estando hoje entre os estudos mais realizados em química medicinal e farmacologia (MACIEL, *et al.*, 2002).

Apesar dos pesquisadores brasileiros dominarem a maioria das tecnologias para a produção de fitoterápicos, existe grande desconhecimento pelo clínico, dos princípios ativos, usos e contra-indicações desses produtos, associada a dificuldade na adesão dos médicos à prescrição por não crerem que os mesmos atuam sobre várias doenças (MACIEL, *et al.*, 2002).

Baseando-se em conceitos e classificações da OMS, planta medicinal é “toda e qualquer planta que possui em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” e que tem a terapêutica comprovada baseada em estudos científicos (VEIGA-JR *et al.*, 2005).

O consumo de produtos medicinais obtidos de plantas e preparados criteriosamente contribui significativamente para a saúde de quem precisa. Esses parâmetros referem-se a identificação do quadro clínico (doença), a obtenção correta da preparação e da planta utilizada além dos efeitos colaterais que talvez o vegetal possa ocasionar ao organismo (BANDEIRA, *et al.*, 1999; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

3.2 Copaíba

No Brasil, a região amazônica é detentora de uma das árvores mais utilizadas em medicina tradicional para o tratamento de várias doenças inflamatórias, conhecida como copaibeira, copaíba, pau d'óleo, copaíbo, copal, mari-mari, bálsamo dos jesuítas, entre outros. O óleo, obtido da árvore, simplesmente é denominado óleo ou bálsamo de copaíba (VEIGA-JR & PINTO, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2004).

Ao que tudo indica, o termo tem sua origem no tupi “cupa-yba” com o significado de “árvore de depósito”, ou seja, que tem “jazida”, fazendo referência ao óleo de seu interior (VEIGA-JR & PINTO, 2002).

Os índios latino-americanos utilizavam o óleo de copaíba há muito tempo para curar feridas de guerreiros durante as batalhas e evitar infecções no coto umbilical de recém-natos (VEIGA-JR & PINTO, 2002; MACIEL *et al.*, 2002). Supõe-se que tal conhecimento foi aplicado ao observar animais feridos esfregarem-se nos troncos das copaibeiras onde posteriormente se percebia cicatrização de suas feridas (VEIGA-JR & PINTO, 2002; MACIEL *et al.*, 2002; FRANCISCO, 2005).

Existem cerca de 16 espécies de copaíba presentes no Brasil. As mais encontradas no país e América do Sul são: *Copaifera officinalis* L. (localizada principalmente no Norte do Amazonas, Roraima, Colômbia e Venezuela), *Copaifera guianensis* (Guianas), *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônicas), *Copaifera confertiflora* (Piauí), *Copaifera langsdorffii* (Brasil, Paraguai e Argentina), *Copaifera cariacea* (Bahia) e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA-JR & PINTO, 2002).

3.3 Estudos fitoquímicos do óleo-resina

Existem informações na literatura afirmando que o primeiro pesquisador a estudar frações do óleo de copaíba foi Schweitzer em 1829 onde relatava a cristalização do ácido copaívico quando se deixava os frascos com óleo por um longo período de tempo sem qualquer tipo de movimentação. Posteriormente também foi descrito por Fehling em 1841, o ácido oxycopaívico e em seguida o ácido metacopaívico por Strauss em 1865, sendo que destes compostos, apenas o ácido paracopaívico apresenta classificação semelhante na atualidade (VEIGA-JR & PINTO, 2002).

Os estudos fitoquímicos demonstram que os óleos de copaíba são constituídos de sesquiterpenos e diterpenos (Figura 1), sendo os principais sesquiterpenos: β -cariofileno e α -copaeno e o principal diterpeno é o ácido copálico considerado biomarcador dos óleos, tendo estes como principais componentes (VEIGA-JR, *et al.*, 2005; BIAVATTI, *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2002; MACIEL, *et al.*, 2007).

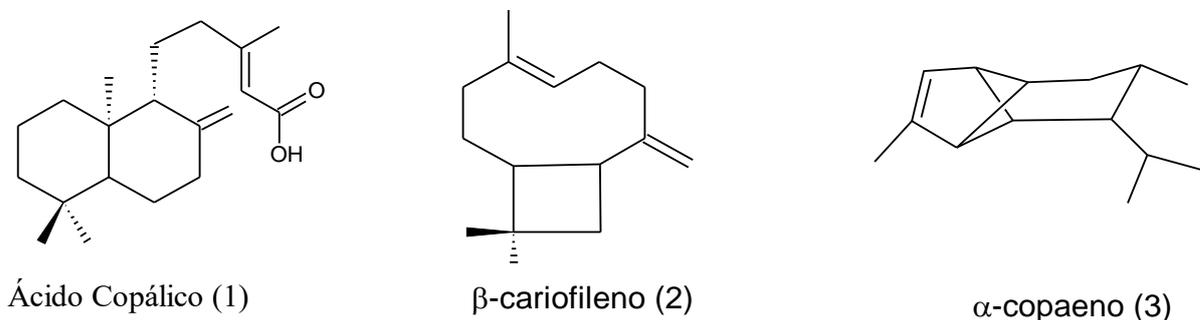


Figura 1: Substâncias majoritárias dos óleos de copaíba.

3.4 Atividade biológica do óleo de copaíba

Os estudos sobre as várias atividades biológicas do óleo-resina de copaíba têm demonstrado atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral, antiedematogênica, bactericida, entre outras, sendo cada vez mais utilizado como produto fitoterápico (SUGIMOTO, 2003; LIMA, *et al.*, 2003; ARAÚJO JÚNIOR, *et al.*, 2005; VEIGA-JR *et al.*, 2006).

Em procedimento experimental de avaliação da redução do edema de pata em ratos tratados com o óleo foi identificada redução do edema em virtude de aumento da permeabilidade vascular pelo óleo (VEIGA-JR, *et al.*, 2006).

Em um trabalho publicado em 2004, os autores propõem a atividade anti-inflamatória da copaíba quando afirma redução do infiltrado de células inflamatórias e edema submucoso

num modelo de colite aguda em ratos tratados oralmente com óleo de *Copaifera langsdorfii* (PAIVA, *et al.*, 2004a).

Em outra pesquisa, também avaliando a atividade biológica do óleo de *Copaifera langsdorfii* utilizado popularmente no tratamento da sífilis, câncer, úlcera, bronquite e diarreia, demonstrou-se potente ação antitumor contra o carcinoma de ratos (tumor murino) sem notáveis reações de citotoxicidade nas demais células (OHSAKI *et al.*, 1994).

A espécie *Copaifera multijuga* também teve seu óleo estudado em ação antitumor de Erlich durante dez dias de tratamento em camundongos e quando comparados ao grupo controle percebeu-se importante ação antineoplásica (GOMES *et al.*, 2008).

Efeitos gastroprotetores foram confirmados em pesquisa realizada induzindo-se lesões gástricas por restrição hipotérmica, etanol e indometacina em ratos e ao administrar-se de 200 à 400 mg de óleo de copaíba, destacou-se a produção de muco, portanto, concluindo-se pela atividade gastroprotetora (PAIVA *et al.*, 1998).

Ainda em se tratando de atividade gastroprotetora em outro procedimento experimental e mesmo ano do autor acima, foi comprovada atividade antiulcerosa, promovendo a cicatrização das úlceras e reduzindo a isquemia mesentérica em modelo de experimento realizado em ratos *wistar* diminuindo infiltrados neutrofílicos bem como a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (PAIVA *et al.*, 1998).

Das várias indicações terapêuticas sugeridas e algumas outras comprovadas, a propriedade anti-inflamatória tem sido estudada em muitas espécies do gênero *Copaifera*: *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huberex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke. As substâncias constituintes tem tido potencial efeito na inibição de citocinas, interleucinas e quimiocinas do processo inflamatório como óxido nítrico, TNF- α , IL-6 bem

como na inibição de outros mediadores importantes na melhora do processo inflamatório (VEIGA-JR *et al.*, 2007).

3.5 Ácidos diterpênicos

Diterpenos com propriedade anti-inflamatória referidos em vários estudos de atividade biológica do óleo de copaíba atestam seus usos populares com base no conhecimento dos povos indígenas nativos e informações obtidas pelos portugueses desde a colonização do Brasil. Sendo o óleo de copaíba pouco estudado no que diz respeito a suas substâncias ativas, sabe-se que potentes princípios ativos como os diterpenos estão presentes nos óleos (VEIGA-JR. *et al.*, 1997; CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JR & PINTO, 2002; VEIGA-JR *et al.*, 2007).

De maneira geral, os terpenos dos óleos essenciais, óleos de copaíba entre outros óleos vegetais tem grandes variações na estrutura química (Figura 2), podendo estar sob a forma de hidrocarbonetos insaturados, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, tropolonas, ácidos carboxílicos, etc. (DEWICK, 2009; SIMÕES, *et al.*, 2004).

Óleos-resina de copaíba apresentam diterpenos com esqueletos estruturais clerodanos, cauranos e labdanos:

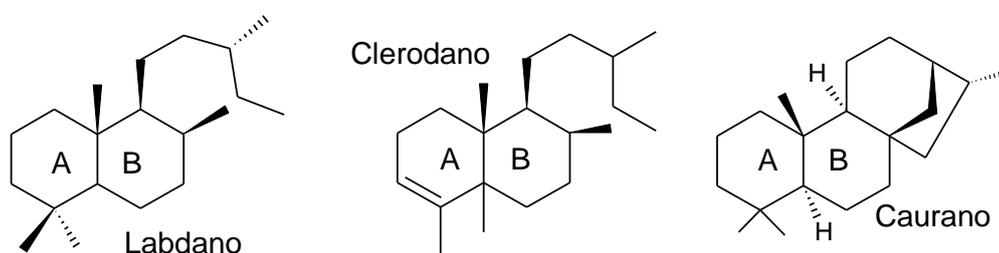


Figura 2: Esqueletos dos ácidos diterpênicos dos óleos de copaíba.

Muitos pesquisadores creem que os ácidos diterpênicos são responsáveis por muitas atividades terapêuticas como ação anti-inflamatória, analgésica, vasodilatadora, anti-fúngica, bactericida, entre outras (VALOTTO *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2002; VARGAS, 2013).

Com relação à investigação química dos óleos de *C. multijuga* foram identificados 35 compostos que correspondem a 70-97% do conteúdo total dos picos cromatográficos, constando porção elevada de sesquiterpenos (88-98%), por outro lado, a proporção de ácidos diterpênicos esteve em torno de 6% (CASCON & GILBERT, 2000; HERRERO-JÁUREGUI, *et al.*, 2011).

Os ácidos diterpênicos encontrados com maior frequência nos óleos são: ácidos poliáltico, hardwíckiico, caurenóico e os derivados do ácido copálico: 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico e *ent*-agático (Figura 3) (VEIGA-JR & PINTO, 2002; LEANDRO *et al.*, 2012).

Pelo menos outras 15 (quinze) substâncias foram isoladas do óleo de *Copaifera langsdorfii* citadas por outros autores, sendo quatro diterpenos com esqueletos do tipo caurano: *ent*-caura-16-eno, *ent*-caura-16-eno-19-al, *ent*-caura-16-eno-19-ol e 19-nor-caura-16-eno-4 α -ol (GRAMOSA, 2001; GRAMOSA *et al.*, 2010); três diterpenos com esqueleto do tipo cledorano: ácido clerodano-15,18-dióico (PINTO *et al.*, 2000), 7 α -acetóxi-hardwíckiico (SPANVELLO & VILA, 1994); e oito diterpenos com esqueleto do tipo labdano: ácido *ent*-4-*epi*-agático (GRAMOSA, *et al.*, 2010), e ácido 7 α -acetoxibacchotricuneatina D (MONTI *et al.*, 1996), 14,15-dinorlabdana-8(17)-eno-13-ona (TINCUSI *et al.*, 2002), ácido 3-hidróxi-copálico, ácido 3-acetóxi-copálico (MAHAJAN & FERREIRA, 1971; CASCON & GILBERT, 2000), (-)-3- β -hidróxi-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-13-ona, (-)-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-3 β ,13-diol (MONTI *et al.*, 1996) e (-)-13(R)-14,15-dinorlabda-8(17)-eno-3,13-diol (ROMERO, *et al.*, 2009; ROMERO, 2007) e uma substância de 35 carbonos, identificada

por (TINCUSI, *et al.*, 2002) produzida pela reação entre um sesquiterpeno monocíclico e um diterpeno labdano – pauperol.

As diferentes espécies de copaíba apresentam variação em suas composições químicas (Figura 6), como referem vários trabalhos, no entanto os fatores determinantes dessa variação ainda são desconhecidos. Contudo, a variação na produção e/ou acúmulo desses metabólitos secundários pode ser afetada por vários fatores, como sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura, ataque de patógenos, entre outros (VEIGA-JR & PINTO, 2002; BIAVATTI *et al.*, 2006). Em razão disso, apesar dos sesquiterpenos e diterpenos ocorrerem em uma proporção similar na maioria dos óleos, são observados perfis qualitativos diferentes na maioria das vezes (GRAMOSA & SILVEIRA, 2005; VEIGA-JR *et al.*, 2006; ZOGHBI *et al.*, 2009a; ZOGHBI *et al.*, 2009b; VARGAS, 2013).

3.6 Atividade biológica dos ácidos diterpênicos

Em estudo de atividade biológica com o ácido caurenóico, verificou-se atividade antimicrobiana, antiparasitária, citotoxicidade contra células tumorais e efeito hemolítico contra eritrócitos humanos e murinos (CAVALCANTI *et al.*, 2006), atividade anti-agregação plaquetária, analgesia, antifúngica e relaxamento de musculatura lisa (CUNHA *et al.*, 2003), ação hipoglicemiante, citotóxica (JOY & REMANI, 2008), inibição de vasoconstrição na musculatura lisa (AMBROSIO *et al.*, 2006), antiespasmódica (ZHANG *et al.*, 2004), efeito anti-inflamatório contra colite murina induzida por ácido acético (PAIVA, *et al.* 2004a; VARGAS, 2013).

O ácido poliáltico tem esqueleto labdano identificado em duas espécies do gênero, a *C. langsdorffii* e a *C. cearensis*. Demonstrou significativo efeito gastroprotetor para modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos *wistar* (REYES-TREJO *et al.*, 2008). Atividade

antimutagênica (MIYAZAWA & SHIMAMURA, 1995) e efeito repelente contra espécie de crustáceo (OHTA & NAWAMAKI, 1978).

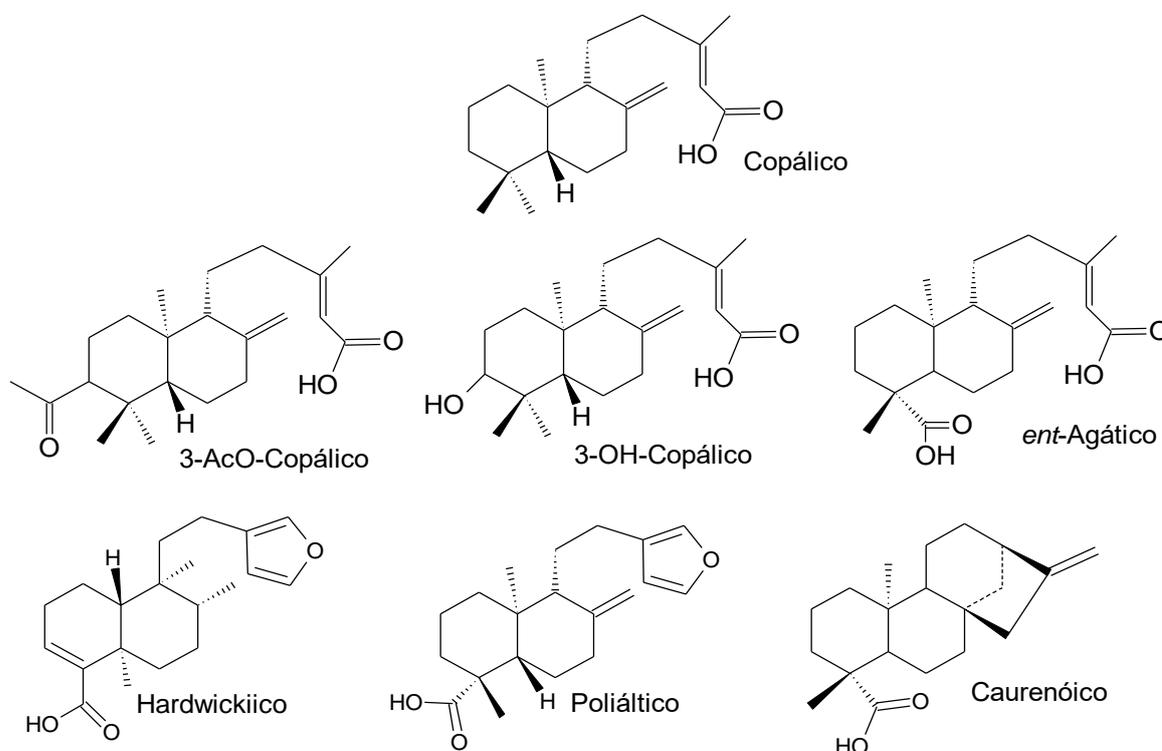


Figura 3: Principais ácidos diterpênicos do óleo-resina de copaíba.

Em pesquisa realizada por OHSAKI *et al.* 1994, o colavenol e ácido hardwíckiico demonstraram potente atividade antitumoral. Os ácidos 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico, 3- β -hidróxi-labdano-8 (17)-eno-15-óico e o *ent*-agático obtidos do óleo resina *C. reticulata* foram testados contra larvas de *Aedes aegypti*, onde os dois primeiros apresentaram forte atividade (GERIS *et al.*, 2008).

O ácido copálico e seus derivados como o 3-acetóxi-copálico e o 3-hidróxi-copálico são referenciados na literatura para diversas atividades biológicas. Grupos de pesquisa procederam ensaios comparativos com estes diterpenos e seus derivados semissintéticos, de atividade antiproliferativa contra células tumorais (IMAMURA *et al.*, 2005) e antimicrobiana contra os principais microrganismos responsáveis pela cárie humana (SOUZA *et al.*, 2011), avaliando inclusive efeitos sinérgicos com drogas reconhecidas (GERIS *et al.*, 2008). O ácido

copálico também inibiu a função chaperona α -cristalina da “*heat shock protein*” HSP27, o que pode influenciar positivamente no tratamento ou prevenção do câncer de próstata (IDIPPILY *et al.*, 2017).

Dentre muitos outros diterpenos isolados de diversos produtos naturais da biodiversidade temos alguns com ação na inibição da colinesterase (uma das estratégias no tratamento da doença de Alzheimer pelos diterpenos arucadiol, miltirone, tanshinone IIa entre outros, isolados a partir de *Perovskia atriplicifolia* e *Salvia glutinosa* (SENOL *et al.*, 2017).

Três novos diterpenos (amarissininas A-C, 1-3) contendo várias funcionalidades oxigenadas (Figura 4) foram isolados das folhas e flores da *Salvia amarissima*. Os mesmos foram testados contra cinco linhagens celulares de câncer: MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), HeLa (carcinoma do colo do útero), HCT-15 e HCT-116 (adenocarcinoma de cólon), apresentando moderada ação citotóxica nas referidas células (BAUTISTA *et al.*, 2016).

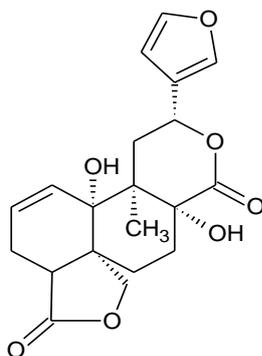


Figura 4: Novos diterpenos obtidos de *Salvia amarissima*.

Os diterpenóides *cassano* (Figura 5), com seu amplo espectro de atividades biológicas, podem ser isolados a partir de várias plantas do gênero Fabaceae (especialmente o gênero *Cesalpinia*) tem importantes atividades cardiotônica, antimalárica e antituberculose (MAURYA *et al.*, 2012).

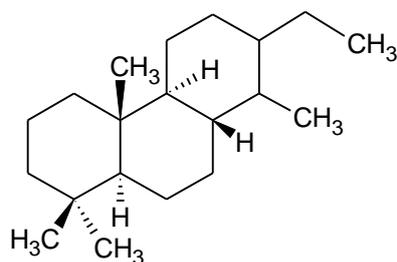


Figura 5: Esqueleto de diterpeno *cassano*.

Diterpenos de tipo labdano de *Hedychium longipetalum* tem importante ação na inibição do óxido nítrico (ZHAO *et al.*, 2015).

Gyparissins A e B, diterpenos de *Euphorbia cyparissias* são agentes citotóxicos contra linhas celulares de câncer de ovário (LANZOTTI *et al.*, 2015).

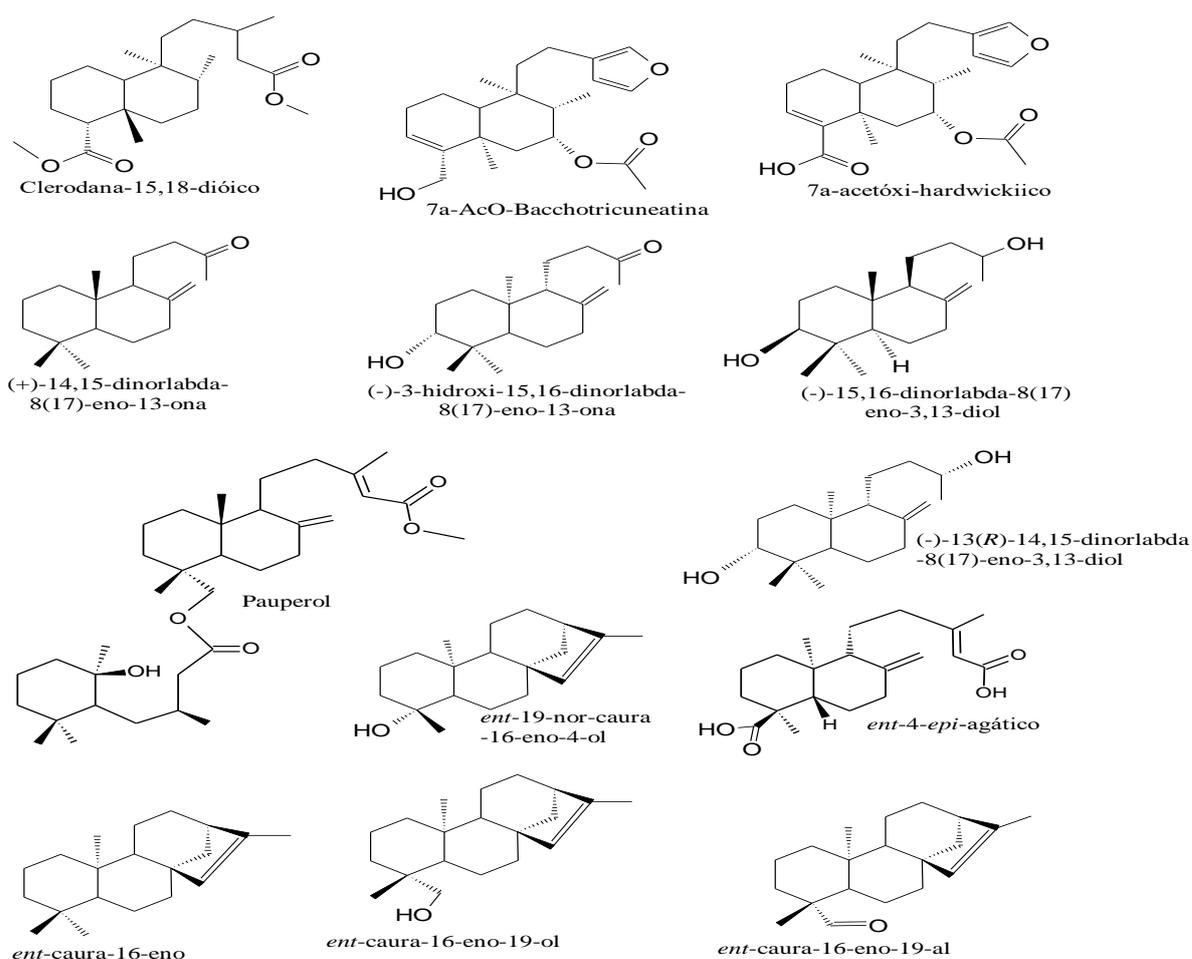


Figura 6: Diterpenos e seus derivados encontrados no óleo-resina de copaíba.

Tabela 1: Ácidos diterpênicos e suas atividades biológicas.

Ácido diterpênico	Atividade biológica	Referência	
Ácido Caurenóico	Ação vasodilatadora	AMBROSIO <i>et al.</i> , 2004	
	Antimicrobiana, antiparasitária, citotoxicidade contra células tumorais, efeito hemolítico contra células humanas e murinas.	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006.	
	Antibacteriana	GIL <i>et al.</i> , 2006	
	Efeito analgésico	OKUYAMA <i>et al.</i> , 1991	
	Efeito antitumor	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006	
	Atividade antiagregação plaquetária, analgesia, antifúngica e relaxamento da musculatura lisa.	CUNHA <i>et al.</i> , 2003	
	Ação hipoglicemiante, citotóxica.	JOY e REMANI, 2008	
	Inibição de vasoconstrição na musculatura lisa	AMBROSIO <i>et al.</i> , 2006	
	Antiespasmódica	ZHANG <i>et al.</i> , 2004	
	Efeito anti-inflamatório contra colite murina induzida por ácido acético	PAIVA <i>et al.</i> , 2004 ^a	
Cauranos	Efeitos inibitórios na tirosina fosfatase 1B	NA <i>et al.</i> , 2006	
	Efeito inibidor da colinesterase	ERTAS <i>et al.</i> , 2007	
	Ação anti-HIV	WU <i>et al.</i> , 1996	
Ácido Poliáltico	efeito gastroprotetor para modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Winstar	REYES-TREJO <i>et al.</i> , 2008	
	Atividade antimutagênica	MIYAZAWA <i>et al.</i> , 1995	
	efeito repelente contra espécie de crustáceo	OHTA e NAWAMAKI, 1978	
Colavenol e hardwíckiico	potente atividade antitumoral	OHSAKI <i>et al.</i> , 1994	
	3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico	Efeito contra larvas do <i>Aedes aegypti</i>	GERIS <i>et al.</i> , 2008
ácido copálico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico	Efeito contra células tumorais	GIACOMINI <i>et al.</i> , 2005	
ácido copálico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico	Efeito antimicrobiano contra os principais microrganismos responsáveis pela cárie humana	SOUZA <i>et al.</i> , 2011a; SOUZA <i>et al.</i> , 2011b	
ácido copálico e hardwíckiico	ácido copálico	Ação antiinflamatória	VARGAS, 2013
		Inibição função chaperona HSP-27	IDDIPILY <i>et al.</i> , 2017.
arucadiol, miltirone, tanshinone IIa	Inibição da colinesterase	SENOL <i>et al.</i> , 2017.	
amarissininas A-C, 1-3	Ação citotóxica em linhagens tumorais	BAUTISTA <i>et al.</i> , 2016.	
diterpenóides cassano	Cardiotônica, antimalárica e antituberculose	MAURYA <i>et al.</i> , 2012.	

3.7 Semissíntese de ácidos diterpênicos

Os produtos naturais utilizados em síntese orgânica são classificados em 3 tipos: produtos naturais brutos, produtos naturais semissintéticos e produtos naturais derivados. Os produtos naturais semissintéticos, são produtos derivados a partir de um modelo de produto natural, utilizando semissíntese, recurso muito investido atualmente com promissoras descobertas de novos fármacos para o tratamento de várias doenças. A aspirina derivada de produto natural descoberta por volta de 1890 ainda é utilizada amplamente como substância analgésica, anti-inflamatória, enquanto que corticosteróides e agonistas β -2, o salbutamol e salmeterol são muito utilizados no controle da asma brônquica. É muito discutido atualmente, sobre potenciais utilizações dos produtos naturais como fármacos a serem lançados no mercado farmacêutico para o tratamento de várias doenças, incluindo câncer e infecções bacterianas principalmente. Já houve várias demonstrações de que o produto natural e/ou as estruturas químicas dos mesmos continuam a desempenhar um papel altamente significativo na descoberta de novos fármacos num processo de desenvolvimento que a natureza de uma forma ou de outra continua a influenciar positivamente para a melhoria da qualidade de vida com reduzidos efeitos colaterais das possíveis drogas a serem descobertas (BUTLER, 2008; NEWMANN & CRAGG, 2012).

Apesar do sucesso da descoberta no passado de várias classes de antibióticos, o mundo desenvolvido continua a sofrer com a morte de muitas pessoas, estando as infecções bacterianas entre a segunda causa de morte em todo o globo especialmente em crianças e idosos. Os casos de resistência crescente e implacável apresentam-se num ritmo bem superior à descoberta de novos agentes antimicrobianos. O principal desafio que permanece em torno dos produtos naturais seria a disposição dos químicos, farmacêuticos e afins na descoberta de novas drogas otimizando processos complexos, muitas vezes na manipulação de ensaios com

diversos grupamentos funcionais debatendo cada vez mais sobre como as empresas farmacêuticas poderiam ser encorajadas a investir cada vez mais em pesquisa e desenvolvimento de atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais, antiparasitárias, etc. (BUTLER & BUSS, 2006).

Os compostos terpenóides constituem grupos de substâncias muito exploradas quimicamente em virtude de sua diversidade estrutural derivando do isopreno podendo ser classificados como: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos e triterpenos. Incluem-se usos desde a mais remota antiguidade, os óleos essenciais de terebentina muito conhecido no antigo Egito, a cânfora introduzida na Europa pelos árabes. Porém os estudos químicos dos terpenos iniciaram-se com a química moderna por volta de 1818 com J. J. Houton de la Billardière. Por volta de 1940 houve um imenso crescimento na química de produtos naturais estimulado pelas técnicas espectroscópicas e cromatográficas mais refinadas. Triterpenos tiveram suas estruturas elucidadas: lanosterol, ácido oleanólico e a β -amirina. O ácido copálico foi isolado pela primeira vez a partir do óleo comercial "Brasil Copal" por Nakano e Djerassi tendo-se mostrado substância química bastante promissora na síntese de vários compostos orgânicos com importantes atividades biológicas (PANTAROTTO, 1996).

Neste sentido, em virtude do grande potencial de suas atividades biológicas, novas moléculas vêm sendo buscadas de forma árdua afim de se isolar compostos naturais para testar suas possíveis bioatividades. As modificações químicas dos mesmos podem ser realizadas por biotransformação, utilizando-se enzimas, ou mesmo reações químicas na esperança de se utilizarem reagentes disponíveis no mercado. As substâncias diterpênicas ou ácidos diterpênicos constituem uma grande classe de compostos naturais que apresentam grande utilização medicinal popular fazendo parte da composição de vários produtos como a

copaíba, e que podem ser utilizados como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos, gastroprotetores, entre outros. Considerando o grande interesse na investigação e modificação estrutural de terpenóides de maneira geral como a modificação realizada com a artemisinina produzindo-se o artesunato de sódio em 1982 para o tratamento da malária grave (HIEN & WHITE, 1993), entre outros, os diterpenos tem sido amplamente utilizados em reações de modificação estrutural para a produção de novos derivados como é o caso do diterpeno derivado tricíclico utilizado contra isquemia cerebral (WANG *et al.*, 2015). Existem estudos atuais propondo a alteração estrutural dos ácidos copálico e caurenóico constituindo grande desafio na elucidação de novas estruturas químicas com importante atividade anti-inflamatória, visto que predominam várias insatisfações com aqueles fármacos anti-inflamatórios que estão no mercado considerando o alto custo e elevados efeitos colaterais (MATOS *et al.*, 2015).

3.4 Docking

Assim sendo, estudos de modelagem molecular nos sítios ativos protéicos demonstram alto reconhecimento em pequenas moléculas. Os químicos medicinais tem explorado tal fato na busca ativa por fármacos inéditos que bloqueiem ou ativem determinada via metabólica ou que exerçam atividade farmacológica. Os métodos *in silico* utilizados em química medicinal procuram melhorar o desenho de moléculas de interesse farmacológico demonstrando interações entre o ligante e a estrutura cristalográfica (TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007). O docking, estima, portanto, a estrutura do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas sendo que a estrutura dos complexos formados entre os bioativos e as enzimas traz informações úteis entre o modo de interação e as ligações que acontecem no sítio ativo onde a compreensão detalhada é importante no reconhecimento de um ligante pela molécula

alvo como relação estrutura-atividade auxiliando na busca por novos fármacos (ERICKSON *et al*, 2004). Neste sentido, estudos de ancoragem molecular crescem vertiginosamente, uma vez que substâncias bioativas, necessitam ser modificadas estruturalmente já que a inserção de grupamentos químicos em suas estruturas permitem a melhora da ação farmacológica tendo os estudos de modelagem molecular revelado informações relevantes para que os pesquisadores possam melhorar cada vez mais as ações dos fármacos, permitindo assim, desenhar-se fármacos de forma racional (MAGALHÃES *et al*, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Estudo experimental, prospectivo, analítico e descritivo. A partir das metodologias a serem desenvolvidas, elaborou-se fluxograma de ações (Figura 7).

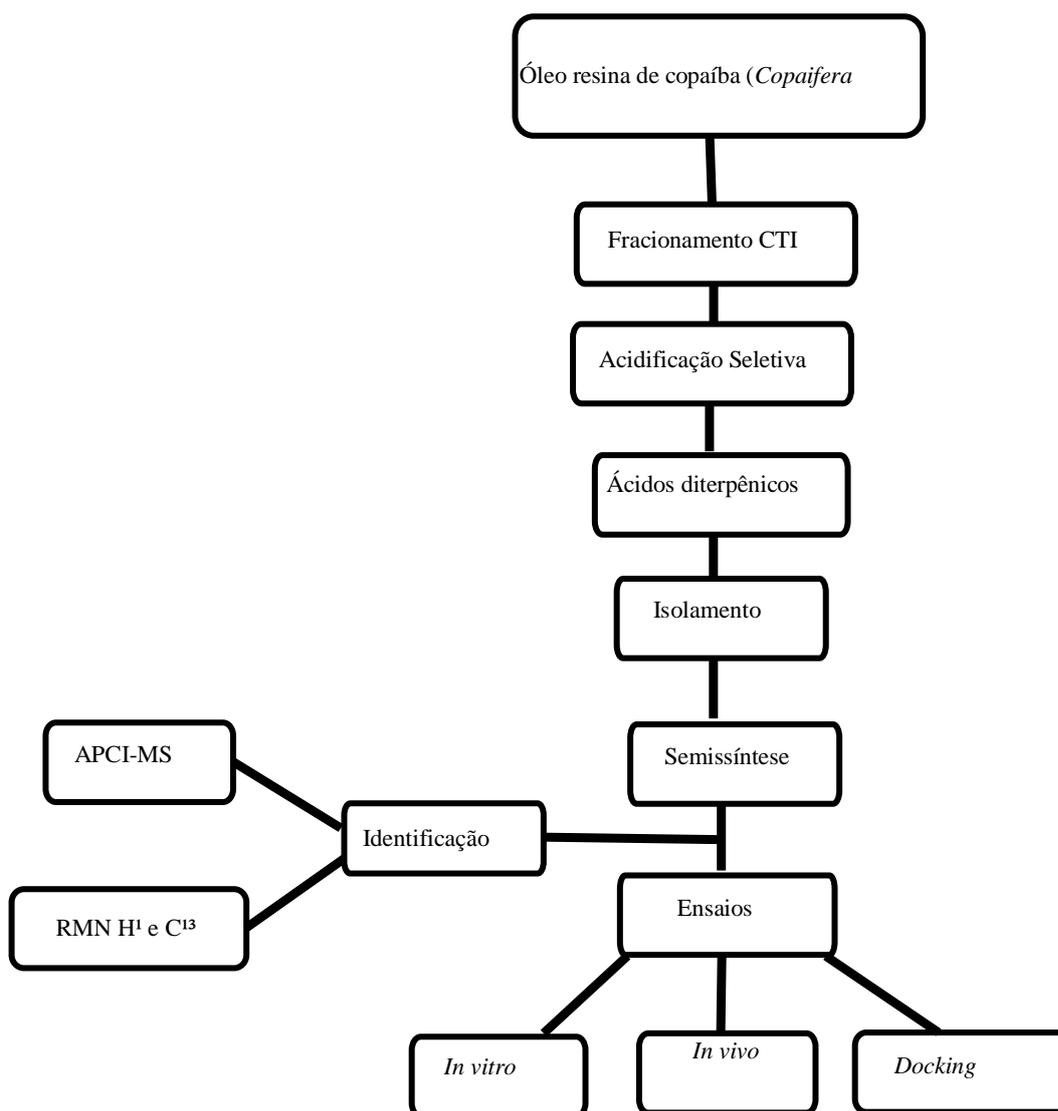


Figura 7: Fluxograma de execução de ações.

4.2 Obtenção de amostras

As amostras dos óleos de copaíba utilizados neste trabalho da espécie *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata* levadas a fracionamento foram obtidas no laboratório Q-Bioma (UFAM). Tendo sido o autor desta pesquisa o executor do isolamento das substâncias.

4.2.1 *Copaifera multijuga* – foram fornecidas várias amostras desta espécie pela pesquisadora MsC. Raquel da Silva Medeiros, coletada na Reserva Ducke e utilizada em seu trabalho de Dissertação (MEDEIROS & VIEIRA, 2008), e também trabalho de dissertação de Karol Barbosa (BARBOSA, 2007), ex-integrantes do grupo de pesquisa Q-BiomA. Amostras utilizadas com data de coleta de 13/06/2012. *Copaifera multijuga* Hayne, Fabaceae, foi coletada na Reserva Adolpho Ducke, em Manaus, Amazonas (Brasil), e catalogada sob o N^o 69 pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Uma vez que o material vegetal foi identificado, um espécime de comprovante foi depositado no herbário do INPA sob o registro N^o 270709. O produto biotecnológico foi extraído de um campo natural da família Burseraceae.

4.2.2 *Copaifera reticulata* – Foi fornecida também amostra desta espécie coletada na Flona Tapajós (Santarém-PA) pela Dra. Ederly Santos Silva, utilizada em seu trabalho de Tese no Programa de Doutorado em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (SILVA *et al.*, 2012). Sem data de coleta informada. Código da amostra AAXFT. O referido acesso das espécies em relação à regularização deste junto ao Ministério do meio ambiente foi devidamente cadastrado no SISGEN sob n^o A1C5880.

4.4 Fracionamento, isolamento, purificação e análise de substâncias

Para obtenção de substâncias puras foram utilizadas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de troca iônica, cromatografia em coluna aberta e cromatografia em coluna fechada com pressão (“*Flash*”).

As substâncias obtidas foram analisadas por meio de espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons (*APCI/MS*), além de espectroscopia por ressonância magnética nuclear em espectrômetro de RMN. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por meio de comparação dos espectros obtidos com os armazenados na Espectroteca Wiley 275 e com dados de substâncias isoladas e purificadas em trabalhos anteriores e da literatura.

4.5 Cromatografia em camada delgada

Foi utilizada como método primário para determinar o melhor solvente a ser aplicado como fase móvel nos métodos cromatográficos desenvolvidos.

O método cromatográfico está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido interações diversas, entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna uma técnica extremamente útil e de grande aplicação no momento de escolha do melhor solvente a ser utilizado na tentativa de separar substâncias.

4.6 Cromatografia com sílica impregnada com KOH

Neste projeto foi utilizada metodologia adaptada com base nos trabalhos de (McCARTHY & DUTHIE, 1962; PINTO *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2005), que é otimizada e consome menor quantidade de solventes, utilizando sílica para cromatografia 70-230 mesh, preparada com solução aquosa de KOH 10%. Cada 100 g de

sílica foram homogeneizadas com 100 mL de solução aquosa de KOH 10%. Após preparo, a sílica foi seca em estufa à 80 °C por 24 h.

Para a realização da análise cromatográfica, utilizou-se coluna de vidro com diâmetro interno entre 3,5 e 4,0 cm e altura variando entre 90 à 95 cm de acordo com a quantidade de material utilizado. As alíquotas de óleo de *C. multijuga* e *C. reticulata* utilizadas foram de 8 gramas submetidas à coluna com SiO₂-KOH inicialmente eluída com hexano (800 mL), seguido de metanol (400 mL).

A fração contendo hexano que corresponde aos compostos não-ácidos foi reservada, e foi utilizada a fração de metanol contendo compostos de caráter ácido onde os mesmos ficaram impregnados na SiO₂-KOH e sofreram “arraste” pelo metanol sob a forma de sais de potássio. Posteriormente, esta mesma fração metanólica foi submetida à tratamento ácido-base em funil de separação de 500 mL com quantidade aproximada de ácidos de 1,2 gramas, sendo adicionada água destilada (aproximadamente 100 mL) e diclorometano (aproximadamente 10 ml pra cada extração), formando solução bifásica. Esta foi acidificada gradualmente em valores de pH 7, 5 e 3 com solução aquosa de ácido clorídrico 1 M e extraída com sucessivas lavagens por diclorometano até a remoção total dos ácidos. Ao término do procedimento obteve-se diferentes frações ácidas do mesmo material.

As frações das colunas com KOH 10% que passaram pelo processo de partição ácido-base em pH 7 e 5, continham, majoritariamente, ácidos copálico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico e portanto, passaram por processo de recristalização e/ou coluna aberta. O processo de purificação visou obter o componente majoritário da fração cristalizada e o componente minoritário (contaminante) dissolvido no solvente utilizado (água mãe). A coluna “flash” foi realizada, principalmente para frações com consistência de óleo como os ácidos copálico e hardwíckiico.

4.7 Cromatografia em coluna aberta

Para a realização desta coluna utilizou-se sílica para cromatografia 70-230 mesh, e coluna de vidro com diâmetro interno e altura variando de acordo com a quantidade de material a ser utilizado. Como fase móvel utilizou-se uma mistura em gradiente dos solventes: hexano e acetato de etila. As concentrações foram definidas com base na análise por CCD, e considerando as características dos ácidos diterpênicos por serem de média a baixa polaridade (Figura 8).

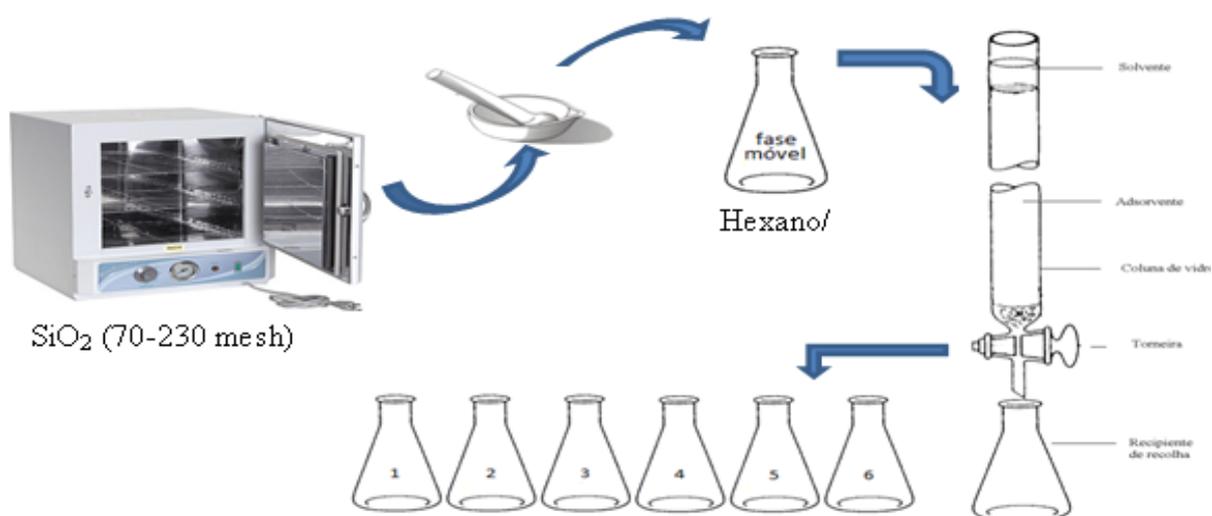


Figura 8: Esquema de realização de coluna aberta (VARGAS, 2013).

4.8 Cromatografia em coluna fechada e sob pressão (“Flash”)

O uso de sílica de partícula menor (230-400 mesh) como adsorvente para essa técnica requer a utilização de um sistema de bombeamento para o empacotamento e eluição, sendo conhecido como Cromatografia “Flash”. A principal etapa ao se utilizar essa técnica é o empacotamento, o qual, entre outros fatores, definirá a eficiência da separação. A sílica foi empacotada a seco. Como fase móvel utilizou-se misturas de hexano, diclorometano e acetato

de etila na proporção Hex:DCM:AcOet 7:1:2, definidas com base nas análises por CCD, e considerando as características dos ácidos diterpênicos, que são de média à baixa polaridade. A metodologia aplicada neste trabalho foi de acordo com STILL *et al.*, (1978).

As modificações estruturais semissintéticas foram realizadas pela pós-doutoranda do Biophar-UFAM, Dra. Ana Cristina da Silva Pinto. Tendo o autor desta pesquisa acompanhado a semissíntese das substâncias aqui obtidas.

4.9 Modificação estrutural do ácido copálico:

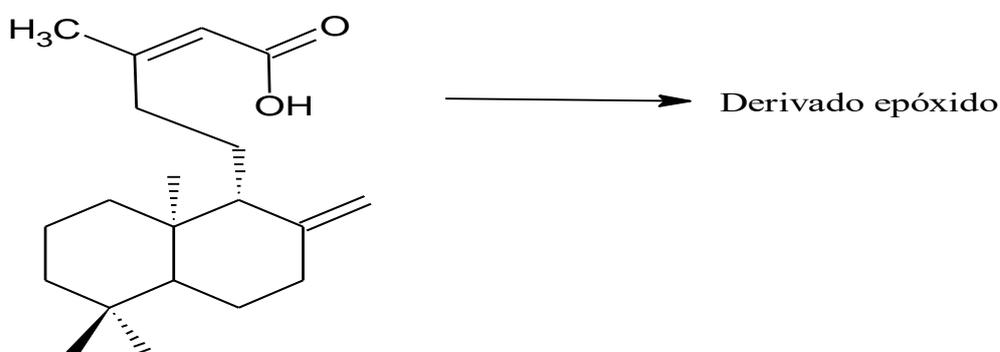


Figura 9: Esquema de modificação estrutural do ácido copálico.

4.9.1 Semissíntese do derivado epóxido do ácido copálico – ACD4- (Reação de epoxidação)

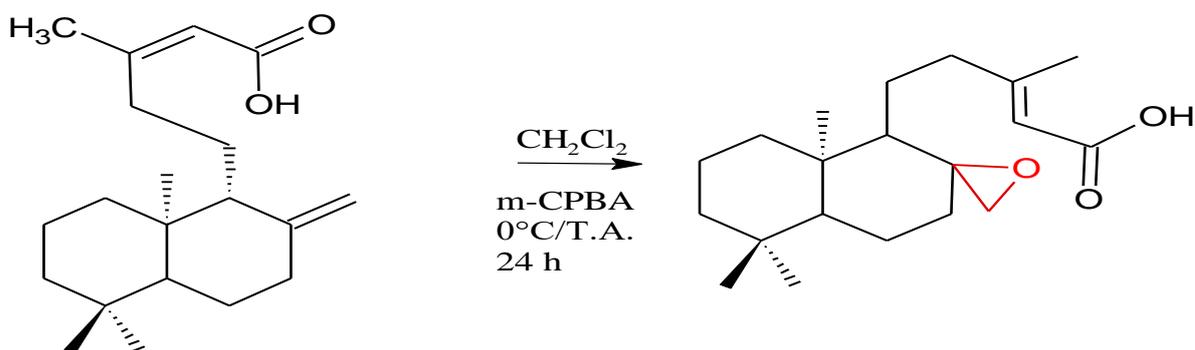


Figura 10: Esquema da reação de epoxidação do ácido copálico.

Procedimento: O ácido copálico (52,0 mg; 0,1708 mmol) foi dissolvido em DCM (6 mL) e adicionado *m*-CPBA (ácido 3-cloroperbenzóico), (44,2 mg; 0,2463 mmol) em banho de gelo e

deixou-se sob agitação à t.a. por 24 h. Após esse tempo adicionou-se 10 mL de solução saturada de NaHCO_3 . O material foi extraído em funil de separação e a solução orgânica lavada de solução NaHCO_3 (5 x 10 mL). A parte orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e filtrado em papel filtro. O produto foi isolado por CCD preparativa em Hex./AcOEt (8:2) rendendo um sólido branco (44,8 mg; R=46,6%). Massa do produto: 320,46 (MATOS *et al.*, 2015).

4.9.2 Modificações estruturais no ácido 3-hidróxi-copálico

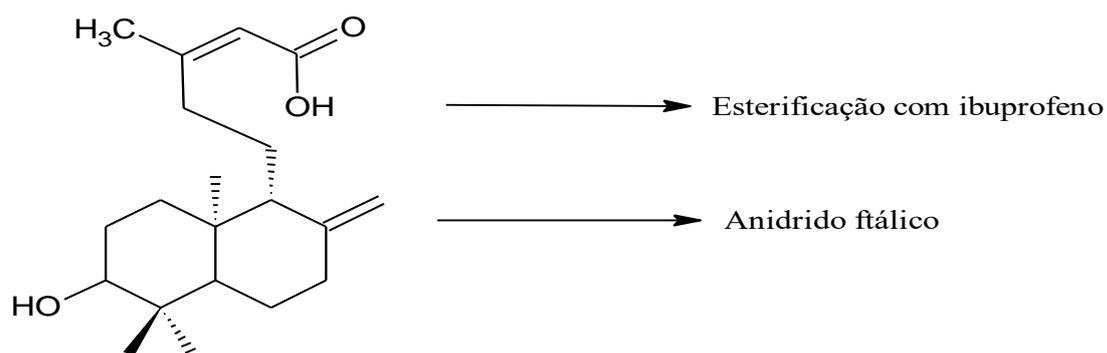


Figura 11: Esquema de modificações estruturais do ácido 3-hidróxi-copálico (02 reações).

4.9.2 Semissíntese: reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno–ACD13B

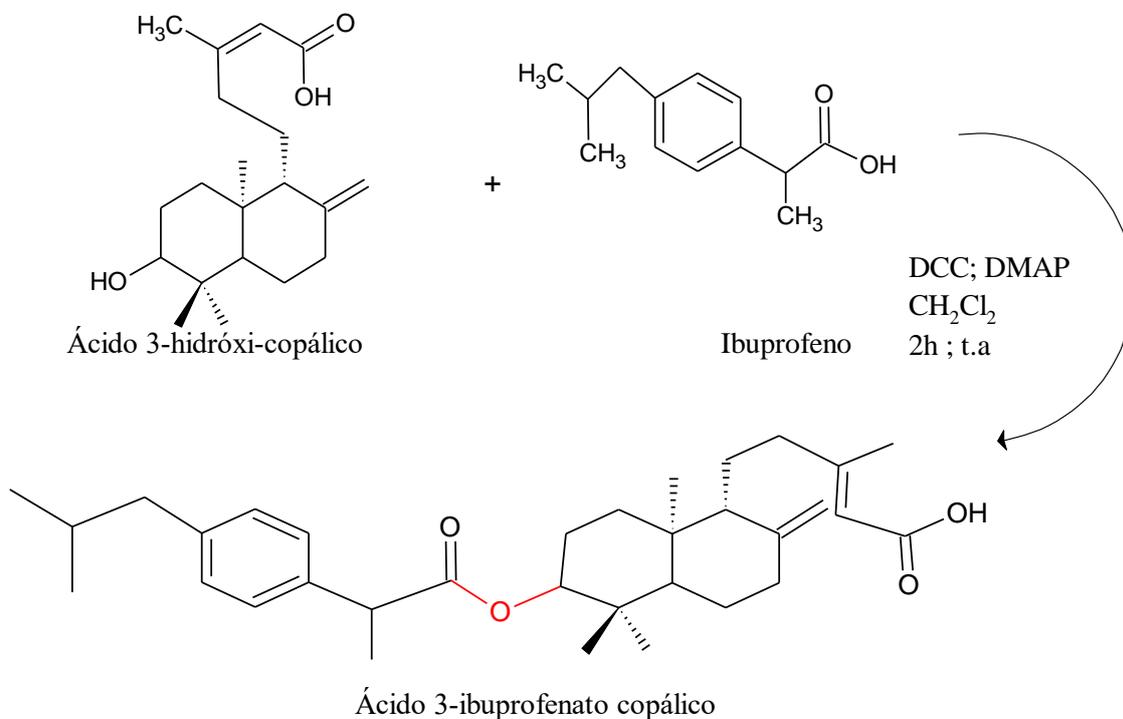


Figura 12: Esquema da reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno.

Tabela 2: Substâncias da reação precedente.

TERPENOS

Ferruginol

Ácido imbricatólico

Ácido oleanólico

Anti-nflamatórios sintéticos

Ibuprofeno

Naproxeno

ÉSTERES

Ferruginil ibuprofenato

Ferruginil naproxenato

Imbricatol-15- γ l-ibuprofenato

Imbricatol-15- γ l-ibuprofenato metil-éster

Imbricatol-15- γ l-naproxenato

Imbricatol-15- γ l-naproxenato metil-éster

Oleanoil ibuprofenato

Oleanoil ibuprofenato metil-éster

Oleanoil naproxenato

Oleanoil naproxenato metil-éster

Fonte: THEODULOZ *et al.*, 2015

Procedimento: O ácido 3-hidróxi copálico (32,0 mg; 0,100 mmol) foi misturado com DCC (40,8 mg; 0,1977 mmol), ponta de espátula de DMAP e ibuprofeno S (+) (26,4 mg; 0,1279 mmol) em DCM seco (5mL) sob agitação em t.a. por 2 h. Após esse tempo a reação foi finalizada pela adição de água destilada (10 mL). A solução foi extraída com DCM (2 x 5mL) e fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro. A solução foi filtrada e evaporada. O resíduo foi recristalizado em AcOEt e separado do sólido insolúvel. A fase AcOEt foi purificada por CCDp em Hex:DCM:AcOEt (7:1:2), rendendo sólido branco (30,0 mg; R=44,6%). Massa do produto: 508,73 (THEODULOZ *et al.*, 2015)

4.9.3 Semissíntese: reação de acilação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico – ACD 51

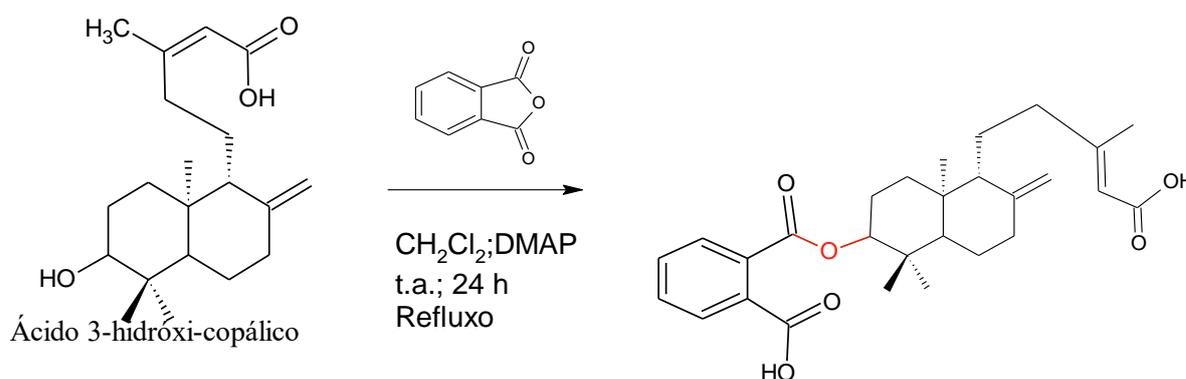


Figura 13: Esquema da reação de reação de acilação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico.

Tabela 3: Substâncias da reação precedente.

Ácido ursólico

Anidrido ftálico

Fonte: CHEN *et al.*, 2011

Procedimento: O ácido 3-hidróxi-copálico (30,1 mg; 0,0941 mmol) foi dissolvido em DCM (2,0 mL) e adicionado ponta de espátula de DMAP e anidrido ftálico (27,9 mg; 0,1882 mmol) sob agitação por 6 h. Adicionou-se água destilada (5 mL) extraíndo-se em DCM (3 x 5 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O produto foi isolado por CCDp em Hex./AcOEt (8:2) rendendo um sólido (17,5 mg; R=30,1%). Massa do produto: 468,58 (CHEN *et al.*, 2011).

4.4 Caracterização química

Após a purificação foi procedida a detecção através da espectrometria de massas, essa técnica espectrométrica foi realizada para avaliar a pureza das substâncias isoladas e para a obtenção de seus espectros de massas. Os espectros de massas foram obtidos no laboratório da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM). Para tanto, utilizou-se espectrômetro de LCQ-Fleet (Thermo Electron) do tipo *ion trap*, operando com fonte APCI (*Atmosphere Pressure Chemical Ionization*). As amostras foram solubilizadas em MeOH HPLC (1 mg/mL) e dessa solução preparou-se outra de 10 ppm sendo os espectros de *full scan* obtidos por inserção direta no aparelho com detecção realizada em modo negativo.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C), DEPT, foram obtidos em espectrômetro da marca Bruker AVANCE III HD, operando a 11,75 tesla, observando os núcleos ¹H e ¹³C a 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe TM) com gradiente de campo na direção Z. Equipamentos da Central Analítica (UFAM). Para solubilização das amostras utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃).

Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS ($\delta=0,00$) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Levou-se

em consideração as multiplicidades dos sinais segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (tripleto) e *m* (multiplete).

4.5 Estudos das atividades farmacológicas

Os ensaios biológicos de atividade anti-inflamatória foram realizados com a colaboração da Dra. Larissa Froede Brito do laboratório de “Sinalização na Inflamação” da faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) tendo como líder a professora Dra. Lirlândia Pires de Sousa. O autor esteve acompanhando integralmente os ensaios biológicos.

4.5.1 Ensaios em cultura de células

Células monocíticas humanas da linhagem THP-1 (TIB202[®], *American Type Culture Collection*[®], EUA) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Brasil) a 37 °C, mantendo-se atmosfera de CO₂ a 5%.

Para o ensaio, as células foram centrifugadas e suspendidas na concentração 2×10^6 cél./mL no meio suplementado acima citado. Para a indução de diferenciação dos monócitos a macrófagos, acetato de forbol miristato (PMA) foi adicionado à suspensão celular obtendo-se concentração final de 10 ng/mL. Após adição do PMA, a suspensão foi transferida para placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça) transferindo-se 500 µL da suspensão celular para cada poço (10^6 cél./poço).

A fim de eliminar as células não aderidas, após 24 h de incubação em condições de cultivo o sobrenadante de cada poço foi substituído por meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil)

enriquecido com 10% de SFB. As células foram incubadas por 16 h em condições de cultivo (37 °C, mantendo-se atmosfera de CO₂ a 5%).

Para avaliação dos efeitos dos bioativos, o meio de cultura dos poços foi descartado e as células foram incubadas por 2 h com as substâncias testadas dissolvidas previamente em DMSO e diluídos em meio RPMI 1640 na concentração 20 µg/mL (500 µL/poço). Dexametasona a 20 µg/mL foi utilizada como controle positivo de anti-inflamação. Para cada grupo realizamos a incubação de 4 poços (n=4). A concentração de DMSO nas soluções dos bioativos aplicados sobre as células não ultrapassou 2% v/v.

Após o pré-tratamento acima descrito, as células foram incubadas por 4 h com LPS (extraído de *Escherichia coli* sorotipo O:111:B4) solubilizado em meio RPMI 1640 na concentração final de 100 ng/mL para estimulação e ativação dos macrófagos. Células incubadas na ausência de LPS foram empregadas como controle do experimento (VAGO *et al.*, 2012).

4.5.2 Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e tratamento com bioativos em diferentes concentrações

Ensaio colorimétrico de MTT foi empregado para avaliar a viabilidade das células THP-1 pré-tratadas com diferentes concentrações de bioativos, seguida de ativação com LPS (MOSMANN, 1983).

Para isso, células THP-1 foram suspensas na concentração 2×10^6 células/mL em meio RMPI enriquecido com SFB 10%. Para induzir diferenciação, PMA foi adicionado à suspensão celular na concentração final de 10 ng/mL.

Em seguida as células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços e incubadas em condições de cultura. A cada poço foram adicionados 10^6 células obtendo-se um volume final de 100 µl por poço.

A fim de eliminação das células em suspensão e carenciamento das células aderidas, após 24 horas de incubação o sobrenadante de cada poço foi substituído por meio RPMI 1640 (Cultilab Brasil) enriquecido com 1% de SFB.

Em seguida, as células foram tratadas com bioativos dissolvido em meio RPMI 1640 nas concentrações 2, 10 e 20 μM . Como controle, foram utilizadas células incubadas com meio RPMI contendo 2% de DMSO, condição que representa a quantidade máxima de DMSO presente nas soluções de bioativos. Após 2 horas de incubação em condições de cultura as células foram ativadas com LPS na concentração final de 100 ng/mL.

Para avaliar a viabilidade celular, o sobrenadante dos poços foi descartado e substituído por 100 μL de MTT dissolvido em meio RPMI 1640 na concentração 400 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida as placas foram incubadas por 2 horas, em condições de cultura, para metabolização do MTT. Decorrido o tempo de incubação, 100 μL de DMSO:isopropanol (1:1) foi adicionado a cada poço e a placa foi submetida à agitação por 15 minutos para dissolução dos cristais de formazan. A densidade ótica dos poços foi lida em 570 nm em espectrofotômetro (Spectramax[®]).

4.5.3 Quantificação de TNF α nos sobrenadantes celulares

Os sobrenadantes de 3 poços de cada grupo foram coletados e analisados em duplicata para quantificação de TNF- α por ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando o kit TNF-alpha duo set, DY210 (R&D Systems, EUA), conforme as instruções do fabricante.

4.6 CEUA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, mediante o protocolo 83/2015 em reunião realizada em 26 de maio de 2015, conforme documento comprobatório anexo ao final desta tese.

4.7 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, entre 8-10 semanas de idade provenientes do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas coletivas, apropriadas, com ventilação adequada e em ciclos de luminosidade (claro/escuro) de 12 h e uma temperatura média de 22 °C.

4.7.1 Modelo murino de pleurisma/pleurisia induzida por LPS

Camundongos foram desafiados com LPS (*E. coli*/O: 111:B4) (250ng/cavidade) ou solução salina (NaCL 0,9%). Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural, lavando-se esta cavidade 2 vezes com 1 mL de PBS contendo EDTA (1 mM). A escolha da dose de LPS foi determinada previamente em nosso laboratório (SOUSA *et al.*, 2010).

4.7.2 Contagem total e diferencial de células

Células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1.200 RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (*ThermoScientific*®) e o sedimento celular ressuspense em 200µL de BSA 3% (p/v) diluído em PBS 1X. Uma alíquota das células foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias (solução de Turk–Imbralab) e, utilizou-se câmara de Neubauer, foi realizada a contagem total de células. A partir dessa contagem, as células foram cito-centrifugadas a 450 RPM, por 5 minutos, utilizando preparações em lâminas de *citospin* (Shandon III) com as células ressuspensas em 100µL de BSA.

4.7.3 Ensaio de expressão protéica

Células recolhidas da cavidade pleural foram lavadas com PBS e os extratos de células inteiras foram preparados como descrito. O teor de proteínas foi quantificado com o reagente

de ensaio Bradford da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Os extratos de células (40 µg) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS desnaturante 10-15% e eletro-transferidos para membranas de nitrocelulose, conforme descrito. (SOUSA *et al.*, 2009) As membranas foram bloqueadas durante a noite a 4 ° C com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (p/v) e tween-20 a 0,1%. Foram feitas três lavagens com PBS contendo 0,1% de Tween-20 e depois incubadas com anticorpos primários específicos (anti-fosfo-IkB-alfa) usando uma diluição de 1:1000 em PBS contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de Tween-20. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado (1:3000). Para normalização das bandas, as mesmas membranas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente com anti-actina usando uma diluição de 1:1000 em PBS contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de Tween-20. Banda imuno-reativa foram visualizadas usando um sistema de detecção ECL, conforme descrito pelo fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Os valores dos níveis de P-IkB α fosforilados foram quantificados por meio de um software de análise densitométrica (ImageJ, Processamento e Análise de Imagens em Java; NIH, Bethesda, MD, EUA). Mudanças nos níveis de proteína foram estimadas, e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias - AU normalizada para os valores de β - actina na mesma amostra.

4.7.4 Ensaio de gastrotoxicidade

Para a avaliação da úlcera gástrica induzida pelo ibuprofeno, a metodologia foi utilizada conforme descrito com modificações (MORIMOTO *et al.*, 1991) Os camundongos balb/C (n=6/grupo) foram pré-tratados por via oral com IBUP (300 mg/Kg) e ACD13B (300 mg/Kg) e o controle negativo (NaCl 0,9%). Após 1, 2 e 4 h de administração, os camundongos foram eutanasiados em uma câmara de CO². Os estômagos foram removidos e

abertos pela grande curvatura. Em seguida, foram fotografadas, e as lesões foram contadas através de planimetria computadorizada, utilizando o programa ImageJ. Os resultados foram expressos como área total de lesão ulcerativa (LU) (mm²).

4.8 Docking

O *docking* foi realizado no AutoDock-Vina pelo aluno de doutorado do grupo Biophar, Rodrigo Otávio Silva Souza. Cada passo envolve uma perturbação aleatória da conformação, seguida por otimização local (usando o algoritmo Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno, que é um método Newton eficiente) e uma seleção na qual a etapa é aceita ou não. Cada otimização local envolve muitas “avaliações” da função de pontuação e o número de avaliações em uma otimização local é guiado pela convergência. A estrutura cristalográfica de raios-X COX-1 e COX-2 (ciclooxygenase-1 e ciclooxygenase-2) foi obtida a partir do website da Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Água das moléculas dos derivados foram removidas, cargas de Gasteiger foram atribuídas e a macromolécula foi salva em formato de arquivo PDBQT usando ADTV. Uma caixa de grade foi centrada no local de COX-1 e COX-2. O protocolo de ancoragem foi testado removendo-se o derivado do inibidor co-cristalizado das substâncias e da proteína e depois acoplado-o no mesmo local.

4.9 Softwares utilizados

ACD/ChemSketch Freeware, um pacote para desenho de estruturas químicas, direcionado para uso doméstico e educacional. O produto oferece nomes químicos da IUPAC (mais de 50 átomos funcionais); criação bidimensional de estruturas; otimização em 3D para melhor visualização; O programa conta com acesso a motores de busca de química pela internet, como PubChem, eMolecules e ChemSpider.

RMN processor, processador ACD/Spectrus fornece suporte para todos os formatos de dados dos principais fornecedores de instrumentos e ajuda com a confirmação de que os dados espectrais correspondem a uma dada estrutura química/fragmentos estruturais, especialmente os utilizados neste trabalho para análise do RMN de H^1 e RMN de C^{13} .

O Graphpad Prism 6, programa de criação de gráficos estatísticos, usado por diversos cientistas. Esta poderosa ferramenta contém diversas funções para a síntese e análise de gráficos, sejam em barras ou usando um plano cartesiano. Este software possui 3 módulos, um contendo a tabela com os valores, um contendo os comentários do projeto e o terceiro contendo o gráfico resultante.

4.10 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm DPM. Os dados foram analisados por análise unidirecional da variância e as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste post hoc de Students-Newmann-Keuls. Valor $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os cálculos foram realizados usando o programa de software prism 6.0 para Windows (software GraphPad, San Diego, CA).

5. Resultados e Discussão

5.1 Isolamento

Selecionou-se o óleo de *C. multijuga* levando-se em consideração o conhecimento da composição química das amostras previamente estudadas no laboratório Q-biomA, e que demonstrasse perfil adequado ao isolamento dos ácidos diterpênicos para modificação estrutural. Esse critério permitiu isolamento com a obtenção de massa significativa de amostras.

Em seguida foi procedido o isolamento de quantidades suficientes para a realização da semissíntese, dos principais ácidos diterpênicos encontrados no óleo da *C. multijuga* e *C. reticulata* sob a forma isolada ou semipurificada, especialmente ácido copálico, ácido 3-hidróxi-copálico e hardwíckiico com a finalidade de se realizar as modificações estruturais nos 2 (dois) primeiros ácidos. Para tornar possível a obtenção dos mesmos em quantidade suficiente, foram realizadas 15 colunas com KOH à 10 % da *C. multijuga* e 03 colunas com KOH à 10% da *C. reticulata*, sendo posteriormente realizada coluna de fracionamento aberta em vários gradientes de concentração Hex.:AcOEt para melhor purificação das frações para em seguida proceder-se o isolamento em coluna sob pressão “flash” utilizando-se fase móvel Hex:DCM:AcOEt 7:1:2. As frações isoladas e puras obtidas foram: ácido copálico (4,8 g), ácido 3-acetóxi-copálico (3,9 g), ácido 3-hidróxi-copálico (1,1 g) e ácido hardwíckiico (3,2 g), tendo sido utilizados na semissíntese para a produção de novas moléculas com atividade biológica, testadas em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Reações	Rendimento (%)	Rendimento (mg)
(ACD4)	46,6	44,8
(ACD13B)	44,6	30
(ACD51)	30,1	17,5

Tabela 4: Rendimento das substâncias semissintetizadas.

5.2 Caracterização espectroscópica de ácidos isolados e padrões utilizados na semissíntese.

As substâncias isoladas utilizadas como precursoras na produção de seus derivados para a semissíntese foram enviadas para análise de espectrometria de massas, onde utilizou-se espectrômetro de LCQ-Fleet operando com fonte de *electrospray*. As amostras foram solubilizadas em MeOH grau HPLC (1 mg/mL) e injetadas diretamente na fonte do aparelho através de seringa com fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, com detecção realizada em modo negativo e fonte *APCI*. Em seguida ao se obter a massa esperada, foi procedido RMN de ^1H e ^{13}C em 500 MHz utilizando-se como solvente clorofórmio deuterado.

Os ácidos diterpênicos obtidos na coluna de sílica com KOH foram posteriormente fracionados em coluna aberta mantendo a proporção de 1:50 com gel de sílica (70-230 mesh), eluída com mistura de solvente em gradiente de hexano e acetato de etila nas proporções de 2,5; 5; 7,5; 12; 15; 20 e 30%, sendo ao fim lavada com AcOEt (100%) e em seguida por MeOH (100%).

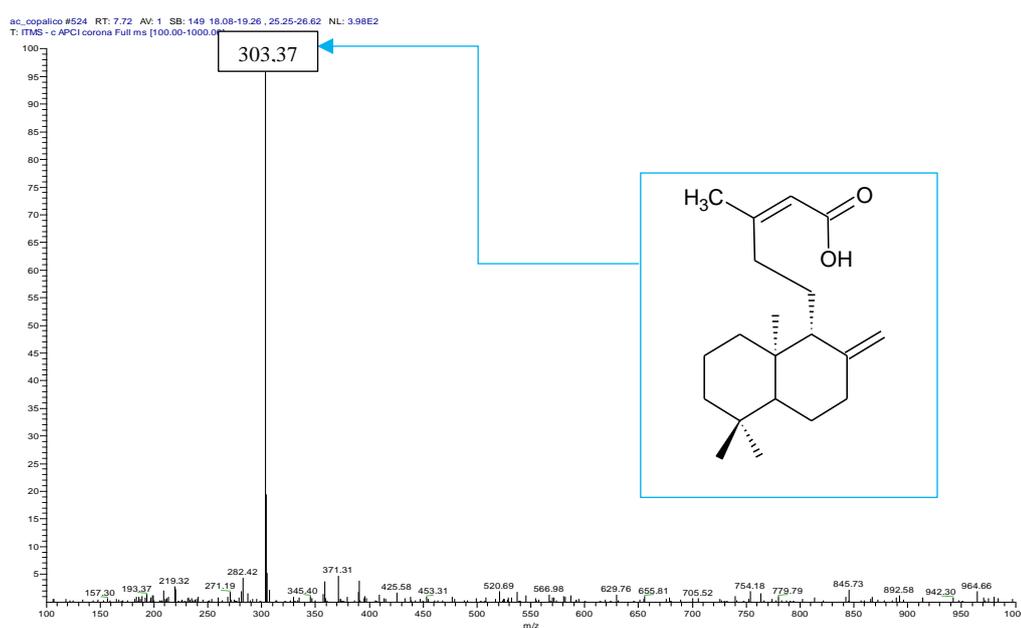


Figura 14: MS-APCI do ácido copálico, modo negativo (PM: 303,37).

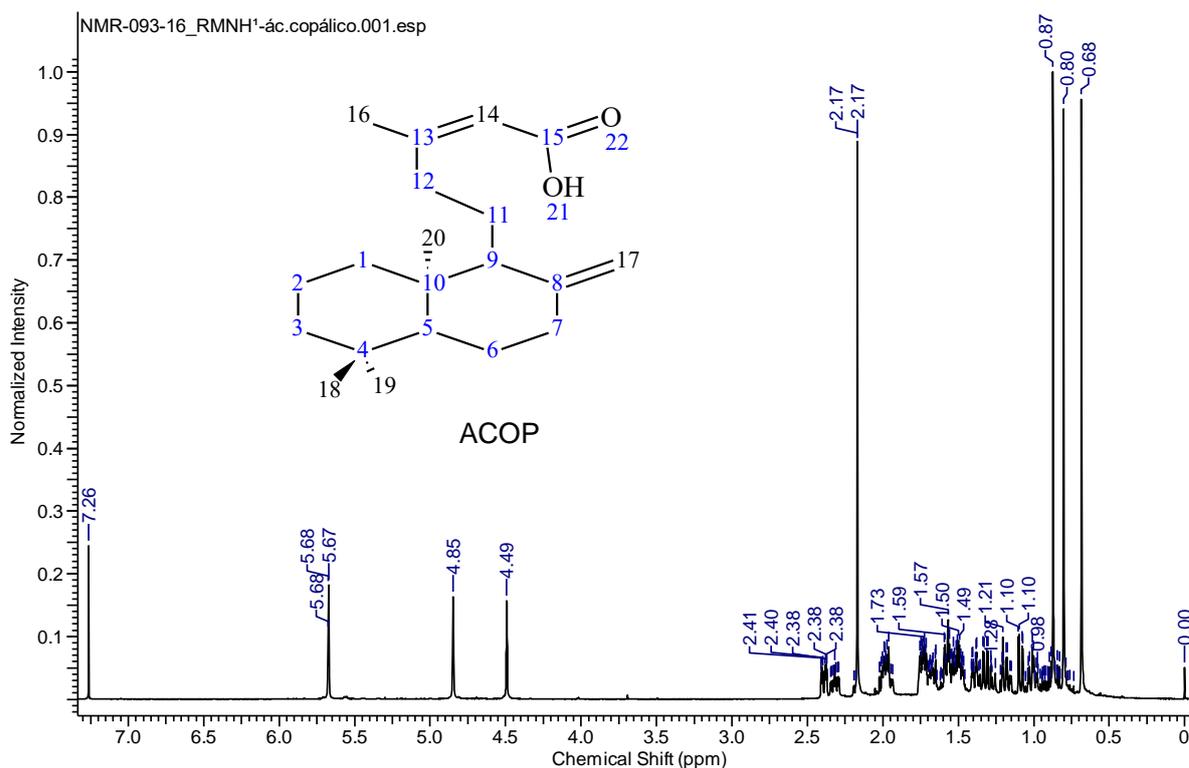


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do ácido copálico (CDCl_3 ; 500MHz).

No espectro de RMN de ^1H do ácido copálico (Figura 15) foram verificados três simples correspondentes as metilas H-20, H-18 e H-19 com deslocamentos em δ 0,68, 0,8 e 0,87, respectivamente, e também o sinal duplo δ 2,17 ($J= 3,0$ Hz) referente a metila H-16. Os dupletos em δ 4,49 ($J= 3,0$ Hz) e 4,85 ($J= 3,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilídínicos da dupla exocíclica H-17 e o duplo duplo em δ 5,67 ($J= 3,0; 9,0$ Hz) ao hidrogênio olefínico H-14. Sinais multipletos definidos para os hidrogênios metilênicos e metínicos dos demais carbonos conforme Tabela 05.

No espectro de RMN de ^{13}C do ácido copálico foram identificados 20 sinais caracterizados pelo espectro DEPT sendo: quatro carbonos metílicos, oito metilênicos, três metínicos e 5 quaternários.

Tabela 5: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ácido copálico.

$n^{o13}\text{C}$	Ácido copálico				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 1,2	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 3	DEPT
1	0,97m; 1,02m	1,0td	42,1	42,2	CH2
2	1,42m; 1,53m	-	19,4	19,5	CH2
3	1,19m	-	38,3	39,1	CH2
4	-	-	33,6	33,7	C
5	1,08dd	1,09m	56,2	55,4	CH
6	1,34dd	1,32qd	24,5	24,5	CH2
7	1,73m; 2,39m	2,39 ddd	38,3	38,4	CH2
8	-	-	148,3	148,4	C
9	1,98m	-	55,5	56,2	CH
10	-	-	39,1	39,8	C
11	1,34d	-	21,5	21,6	CH2
12	2,32m	2,32ddd	40,1	40,1	CH2
13	-	-	164,1	164,4	C
14	5,67dd	5,67sl	114,8	114,9	CH
15	-	-	171,9	172,3	C
16	2,17d	2,17s	19,3	19,4	CH3
17	4,85d; 4,49d	4,85sl; 4,49sl	106,4	106,5	CH2
18	0,87s	0,87s	33,6	33,7	CH3
19	0,80s	0,80s	21,7	21,8	CH3
20	0,68s	0,68s	14,4	14,6	CH3
21	-	-	-	-	-

Fonte: (1) VARGAS, 2013; (2) ROMERO, 2007; (3) SILVA *et al.*, 2012.

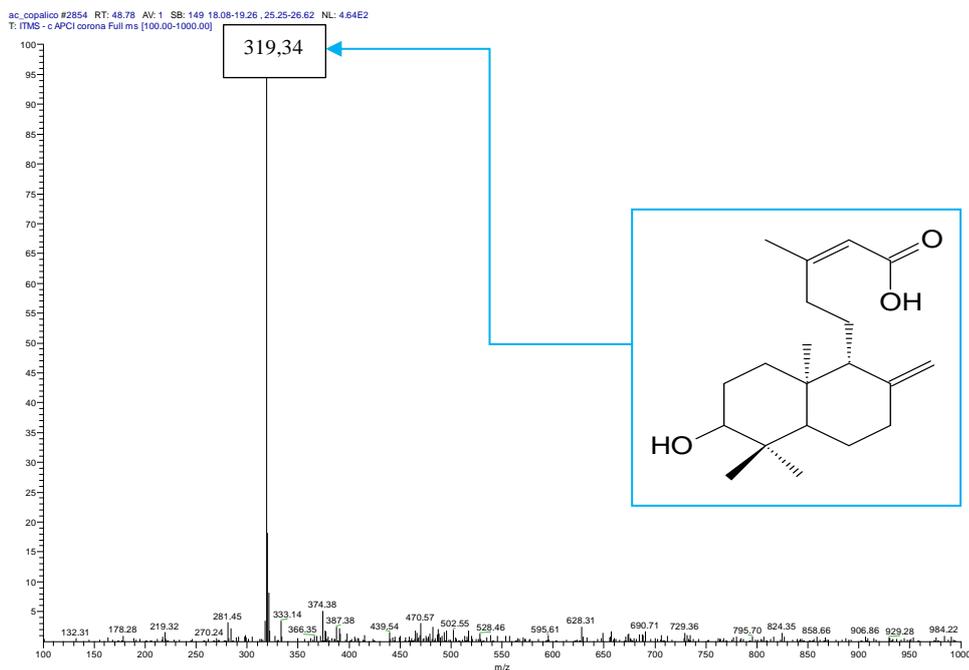


Figura 16: MS-APCI do ácido 3-hidróxi-copálico, modo negativo (PM: 319,34).

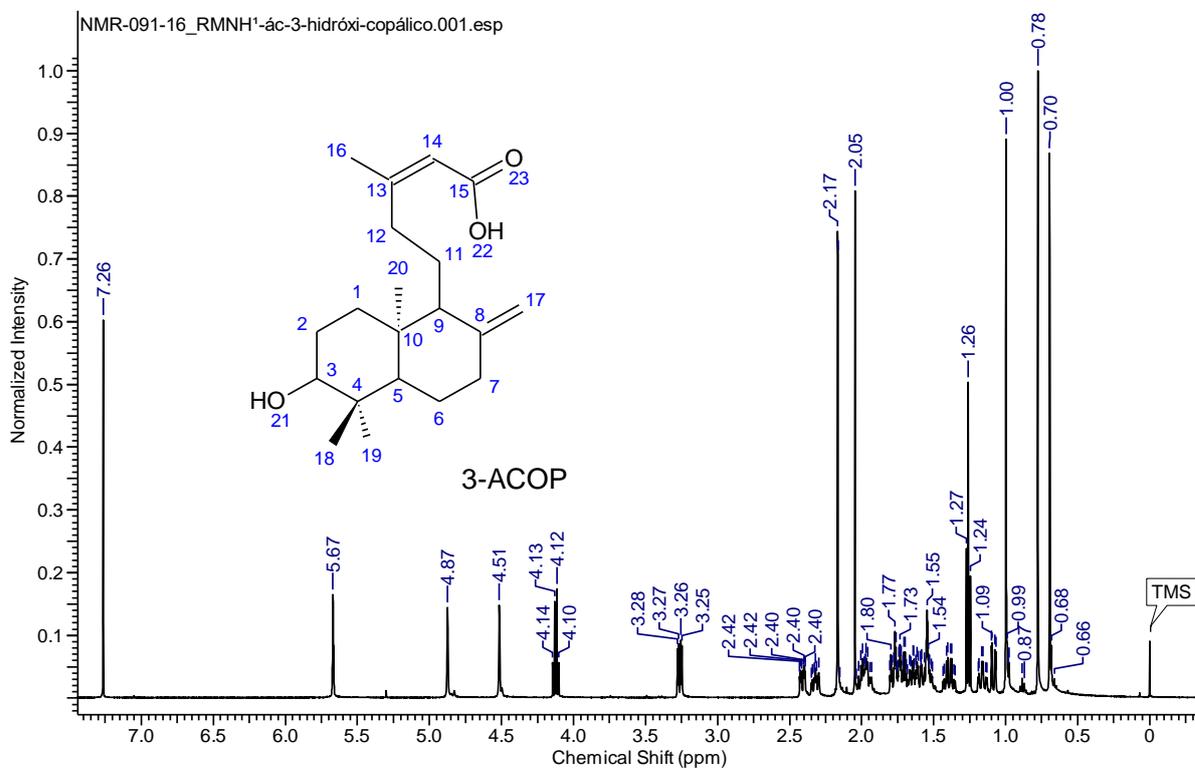


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H do ácido 3-hidróxi-copálico (CDCl₃; 500MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 17) do ácido 3-hidróxi-copálico apresentou mesmo perfil de sinais dos espectros do ácido copálico, onde se observam simpletos em δ 4,51 e 4,87 (H-17) e duplete em δ 5,67 ($J= 3,0$ Hz) para H-14, um duplo duplete em δ 3,26 ($J= 3,0; 9,0$ Hz) para H-3 e um duplo duplete em δ 4,12 ($J= 3,0; 9,0\text{Hz}$) atribuído ao hidrogênio H-21, respectivamente no local de inserção do grupo hidroxila. Sinais simpletos em δ 2,17, δ 1,00, δ 0,78 e δ 0,70 para os grupos metilas da cadeia.

No espectro de RMN de ^{13}C do ácido 3-hidróxi-copálico foram identificados 20 sinais caracterizados pelo espectro DEPT sendo: quatro carbonos metílicos, sete metilênicos, quatro metínicos e 5 quaternários (Tabela 6).

Tabela 6: Dados obtidos de RMN 1H e 13C do ácido 3-hidróxi-copálico.

$n^{o13}C$	Ácido 3-hidróxi-copálico				
	δ^1H (ppm)	δ^1H Ref. 1,2	$\delta^{13}C$	$\delta^{13}C$ Ref. 1	DEPT
1	0,99s; 2,32m	2,32ddd	37,1	37,1	CH2
2	1,80m	--	27,9	27,9	CH2
3	3,26dd	3,27dd	78,8	78,7	CH
4	-	--	34,0	33,4	C
5	1,08dd	1,08dd	55,8	54,6	CH
6	1,25t	--	23,9	24,0	CH2
7	1,16td; 2,41m	1,16dt; 2,40ddd	38,0	38,1	CH2
8	-	--	147,6	147,5	C
9	1,38m	1,36dd	54,6	55,8	CH
10	-	--	39,1	39,4	C
11	1,54m	1,48qd	21,6	21,7	CH2
12	1,98m	2,27-2,37m	39,9	39,8	CH2
13	-	--	163,8	160,7	C
14	5,66d	5,64sl	114,8	114,9	CH
15	-	--	171,3	172,4	C
16	2,17s	2,17d	19,2	19,0	CH3
17	4,51s; 4,87s	4,51sl; 4,86sl	106,8	106,7	CH2
18	1,00s	1,01s	28,3	28,3	CH3
19	0,77s	0,78s	15,4	15,5	CH3
20	0,70s	0,70s	14,5	14,6	CH3
21	4,12q	3,69s	-	-	OH

Fonte: (1) ROMERO, 2007; (2) VARGAS, 2013.

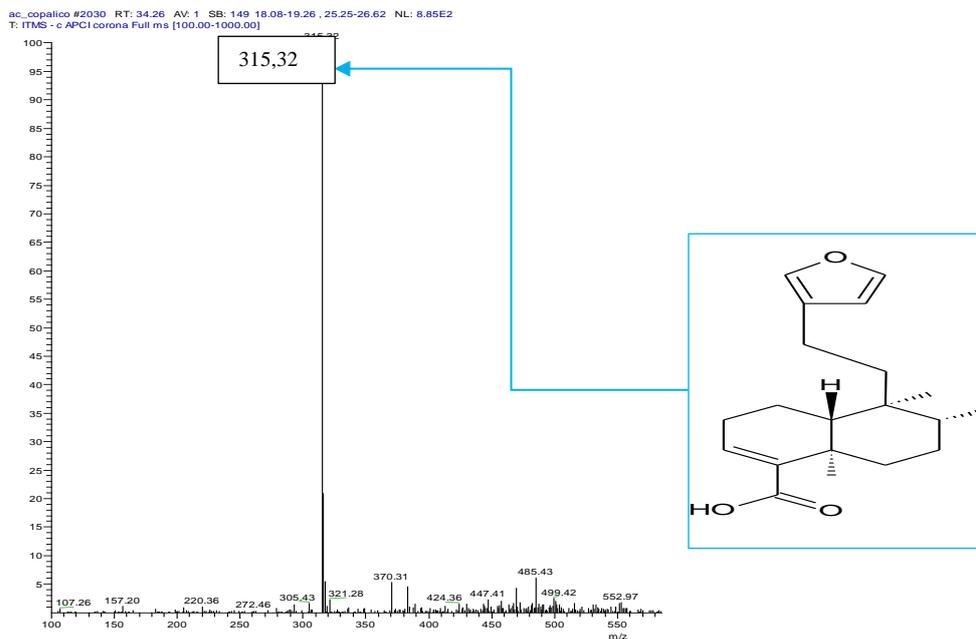


Figura 18: MS-APCI do ácido hardwíckiico, modo negativo (PM: 315,32).

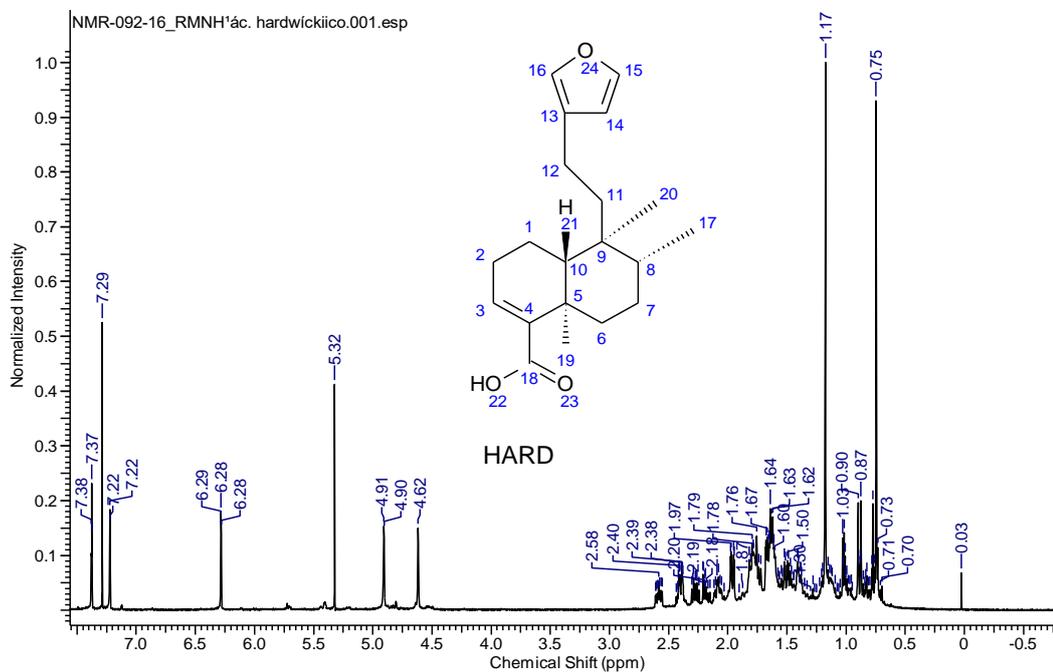


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do ácido hardwíckiico (CDCl_3 ; 500MHz).

Após análise dos espectros foi possível reconhecer os sinais da substância ácido hardwíckiico. E uma vez que este ácido não é inédito na literatura, sua identificação se deu por simples comparação dos picos (Figura 19). Análise do espectro de RMN de ^1H do ácido hardwíckiico foram verificados 3 simpletos correspondentes as metilas H-17, H-19 e H-20 com deslocamentos em δ 0,75, δ 1,02, e δ 0,87, respectivamente e também os sinais simpletos δ 7,29, δ 7,37 e 6,26 referente aos hidrogênios olefínicos H-16, H-15 e H-14, respectivamente. Os multipletos em δ 1,62 e δ 1,64 foram atribuídos ao hidrogênio metilênico H-11. O simpleto com deslocamento em δ 1,17 e multiplete em δ 2,4 foram atribuídos ao hidrogênio metilênico H-6 e também o simpleto com deslocamento em δ 7,22 atribuído ao hidrogênio olefínico H-3.

No espectro de RMN de ^{13}C do ácido hardwíckiico (Tabela 7) foi possível reconhecer os pontos em comparação com a literatura sendo identificados 20 sinais caracterizados pelo espectro DEPT : três carbonos metílicos, seis metilênicos, cinco metínicos e seis quaternários.

Tabela 7: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ácido hardwíckiico.

$n^{13}\text{C}$	Ácido hardwíckiico				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 1	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 1	DEPT
1	-	1,64-1,73m	14,7	17,4	CH2
2	-	1,40-1,46m	27,9	27,3	CH2
3	7,22s	6,80-6,90m	138,7	140,3	CH
4	-	-	142,7	141,5	C
5	-	-	37,8	37,6	C
6	1,17s; 2,40m	1,17td; 2,4td	33,2	35,8	CH2
7	-	-	28,3	27,5	CH2
8	-	-	37,1	36,2	CH
9	-	-	39,3	38,8	C
10	-	1,36dd	46,4	46,7	C
11	162-1,64m	1,64-1,73m	39,2	38,6	CH2
12	-	-	18,4	18,2	CH2
13	-	-	125,4	125,6	C
14	6,26s	6,23dd	110,9	110,9	CH
15	7,37s	7,32t	147,7	142,7	CH
16	7,29s	7,18m	135,3	138,4	CH
17	0,87s	0,88s	16,3	15,9	CH3
18	-	0,80-0,86m	172,1	172,4	C
19	1,02s	1,25s	21,7	20,5	CH3
20	0,75s	0,77s	13,5	18,3	CH3

Fonte: (1) VARGAS, 2013.

O ibuprofeno S(+) obtido da Sigma foi utilizado na reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico e para isso confirmou-se RMN de H^1 e C^{13} a fim de facilitar a identificação estrutural após semissíntese. A identificação ocorreu pela simples comparação dos sinais já que estas substâncias não são inéditas e facilmente encontradas na literatura.

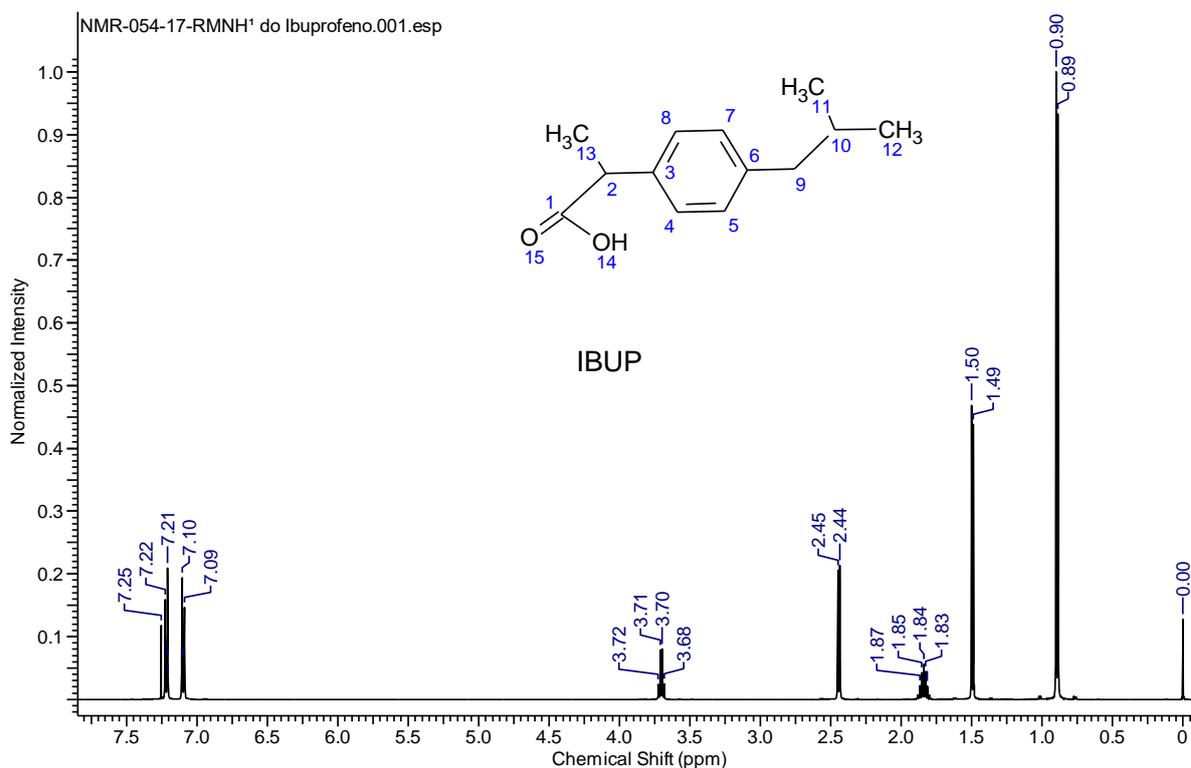


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do ibuprofeno (CDCl_3 ; 500MHz).

Após análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 20) do ibuprofeno da Sigma, observou-se os seguintes sinais: duplete δ 0,89 ($J= 3,0$ Hz) para H-12 e H-13, sexteto em δ 3,70 para H-2, sinais dupletos em δ 7,21 ($J= 3,0$ Hz) para H-4 e H-8, em δ 7,10 ($J= 3,0$ Hz) para H-5 e H-7, em δ 1,49 ppm ($J= 3,0$ Hz) para H-9, em δ 2,44 ppm ($J= 3,0$ Hz) para H-10 e sinais quinteto em δ 1,84 ppm para H-11.

No espectro de RMN de ^{13}C do ibuprofeno (Tabela 8) foi possível reconhecer os pontos em comparação com a literatura sendo identificados 13 sinais caracterizados pelo espectro DEPT : três carbonos metílicos, um metilênico, seis metínicos e três quaternários.

Tabela 8: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do ibuprofeno.

$n^{13}\text{C}$	Ibuprofeno				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 2	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 2	DEPT
1	-	-	180,6	174,5	C
2	3,70quart	3,69m	45,1	45,6	CH
3	-	-	137,0	138,2	C
4	7,21d	7,22d	129,4	129,2	CH
5	7,10d	7,10d	127,3	127,3	CH
6	-	-	129,4	129,2	C
7	7,10d	7,10d	127,3	127,3	CH
8	7,21d	7,22d	140,9	140,3	CH
9	1,49d	1,50d	18,1	18,1	CH3
10	2,44d	2,46d	44,9	45,0	CH2
11	1,84quint	-	30,2	30,2	CH
12	0,89d	0,91d	22,4	22,3	CH3
13	0,89d	0,91d	22,4	22,3	CH3
OH	-	-	-	-	-

Fonte: (1) "Spinsolve ^{13}C Ibuprofen (2013); (2) THEODULOZ *et al.*, 2015.

5.3 Semissíntese de compostos diterpênicos (3 reações)

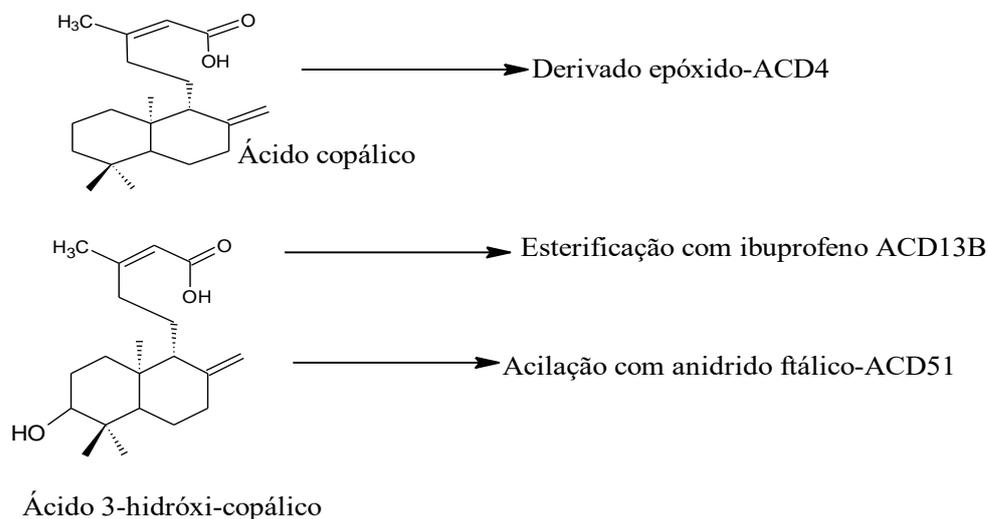


Figura 21: Esquema de reações produzidas cujas análises de MS e RMN ^1H e ^{13}C sugerem tratar-se das moléculas esperadas.

As reações semissintetizadas foram enviadas para análise de espectrometria de massas, utilizando-se espectrômetro de LCQ-*Fleet* operando com fonte APCI (Atmospheric pressure chemical ionization). As amostras foram solubilizadas em MeOH HPLC (1 mg/mL) e injetadas diretamente na fonte do aparelho através de seringa fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, com detecção realizada em modo negativo. As análises de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizadas após obtenção da massa esperada dos produtos semissintetizados.

SUBSTANCIAS_SEMISINTETICAS_2 #1092-1100 RT: 19 14-19 26 AV: 9 NL: 5,30E3
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-

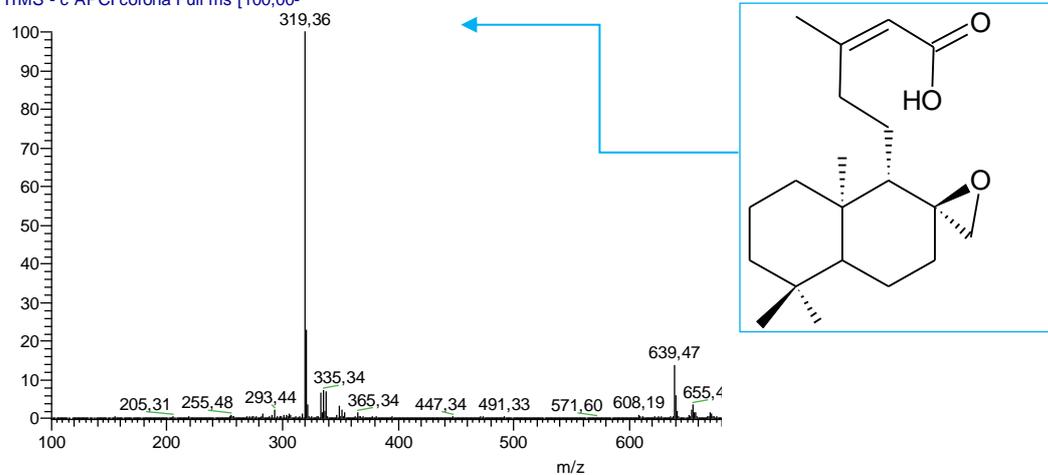


Figura 22: MS-APCI do derivado epóxido do ácido copálico (ACD4), modo negativo (PM:319,36).

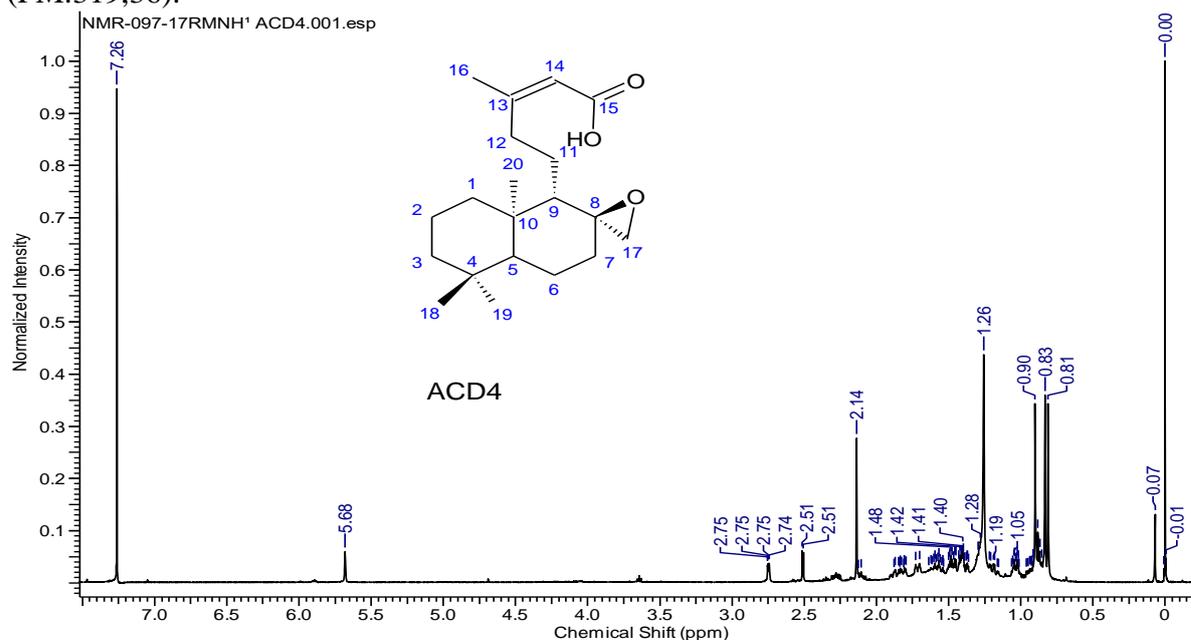


Figura 23: Espectro de RMN de ¹H da reação de epoxidação do ácido copálico (CDCl₃; 500MHz).

Após análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 23) do epóxido do ácido copálico, observou-se os seguintes sinais: simpletos com deslocamentos em δ 0,81, δ 0,83 e δ 0,90 atribuídos aos hidrogênios metílicos H-20, H-19 e H-18. Também o multipletto com deslocamento em δ 4,06 e simpleto δ 4,69 atribuídos ao hidrogênio metilênico da posição H-

17. O simpleto com deslocamento em δ 2,14 atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-16. O simpleto com deslocamento em δ 5,68 atribuído ao hidrogênio olefínico da posição H-14. Multiplete com deslocamentos entre δ 2,25-2,31 atribuídos ao hidrogênio metilênico da posição H-12. O triplete com deslocamento em δ 3,64 atribuído ao hidrogênio metínico da posição H-9. Os dupletos com deslocamentos em δ 2,51 e δ 2,75 atribuídos ao hidrogênio metilênico da posição H-7. O multiplete com deslocamento em δ 2,34 atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-6. O multiplete com deslocamentos entre δ 1,18 e 1,19 atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-3. Também o simpleto com deslocamento em δ 1,26 atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-1.

No espectro de RMN de ^{13}C do epóxido do ácido copálico (Tabela 9) foi possível reconhecer os sinais em comparação com a literatura sendo identificados 20 sinais caracterizados pelo espectro DEPT : quatro carbonos metílicos, oito metilênicos, três metínicos e cinco quaternários.

Tabela 9: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C do epóxido do ácido copálico (ACD4).

$n^{13}\text{C}$	ACD4 epóxido do ácido copálico				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 1	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 1	DEPT
1	1,26s		39,1	42,1	CH2
2			18,7	19,5	CH2
3	1,18-1,19m	1,19t	41,9	39,2	CH2
4	-	-	33,5	33,7	C
5			55,1	55,2	CH
6	2,34m		21,9	22,0	CH2
7	2,51d, 2,75d	2,44d; 2,24-2,16m	33,5	36,6	CH2
8	-	-	58,9		C
9	3,64t	2,68dd	53,4		CH
10	-	-	40,4	40,6	C
11			29,7	20,1	CH2
12	2,25-2,31m	-	42,8		CH2
13	-	-	163,8	163,9	C
14	5,68s	5,60m	114,2	115,1	CH
15	-	-	169,8	172,4	C
16	2,14s	2,13-2,08m	19,9	18,9	CH3
17	4,06m; 4,69s	-	50,8		CH2
18	0,90s	0,83s	33,4	33,6	CH3
19	0,83s	0,76s	21,7	21,8	CH3
20	0,81s	0,74s	14,7	14,8	CH3

Fonte: (1) MATOS *et al.*, 2015.

esterificacao_3ohcopalico+ibuprofeno #133-141 RT: 2 98-3 13 AV: 9 NL: 4,38E3
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-

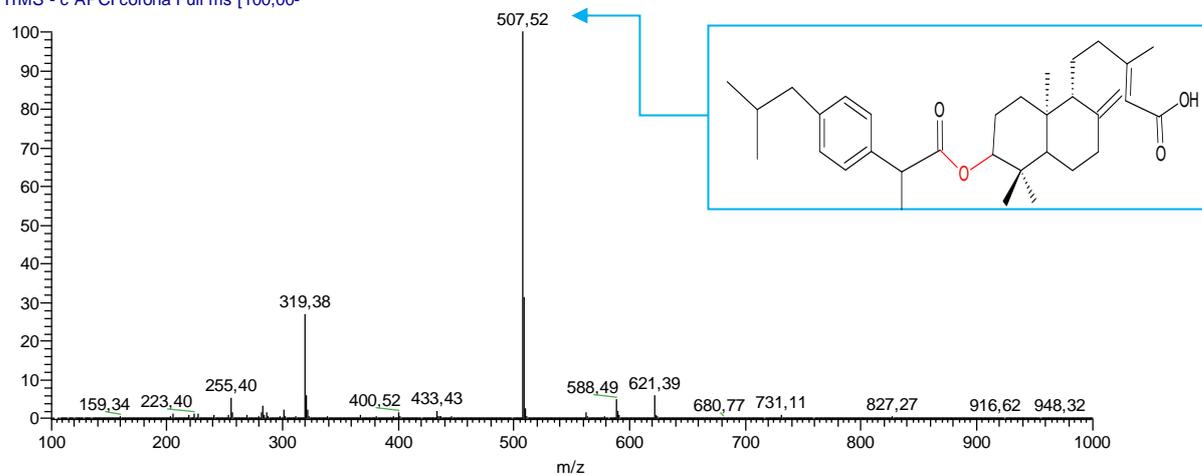


Figura 24: MS-APCI do derivado esterificado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B, ácido 3-ibuprofenato-copálico), modo negativo (PM: 507,52).

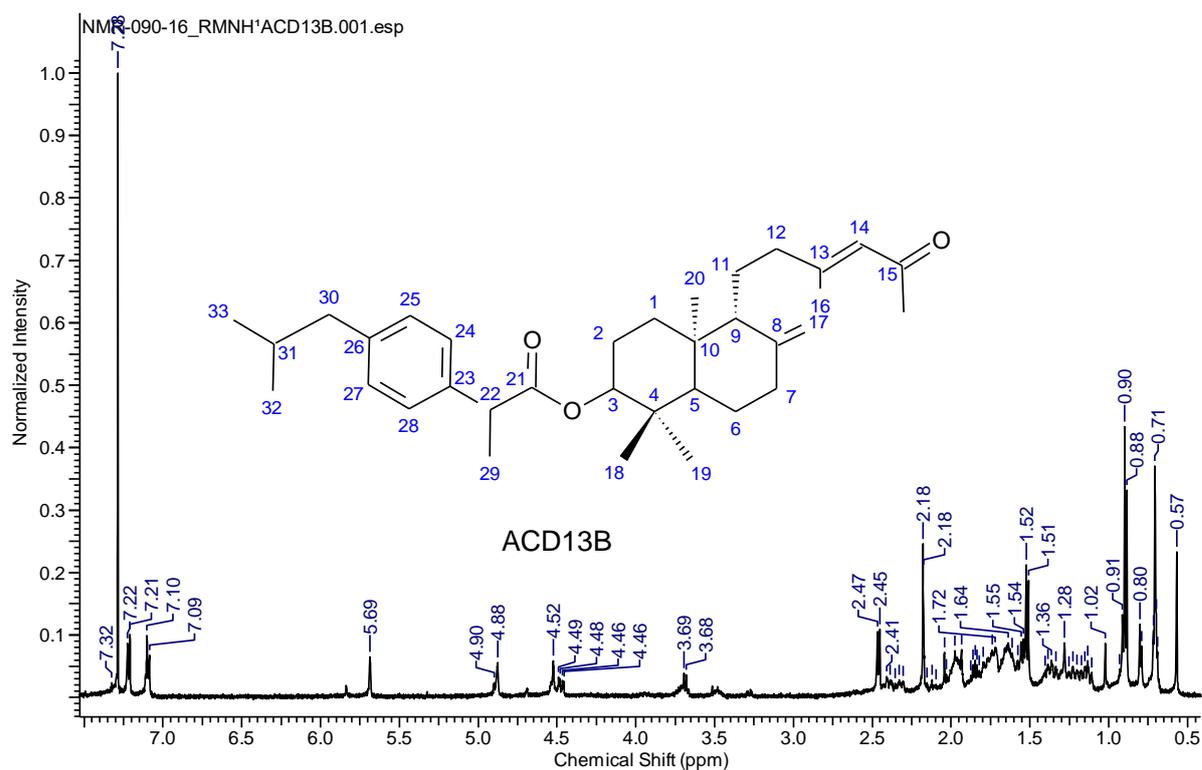


Figura 25: Espectro de RMN de ¹H da reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (CDCl₃; 500 MHz).

Após análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 25) do ACD13B (Esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno), observou-se os seguintes sinais: simples para os grupos metilas δ 2,18 para H-16, δ 1,02 para H-18, δ 0,79 para H-19, δ 0,71 para H-20, δ 0,88 para H-32 e δ 0,90 para H-33, simples para o grupo metilênico em δ 5,69 para H-14, duplo δ 1,51 ($J= 3,0$ Hz) para H-29, em δ 2,46 ($J= 3,0$ Hz) para H-30, simples em δ 4,88 para H-17 e duplo duplo em δ 4,47 para H-17 ($J= 3,0; 9,0$ Hz), múltiplos em δ 0,80 e 0,72 para H-5 e H-9, em δ 1,28, 1,40 e 1,79 para H-7 e H-12 e múltiplos para H-1, H-2, H-3, H-6 e H-11, duplos em δ 2,46 ppm ($J= 3,0$ Hz) para H-30, em δ 7,10 ppm ($J= 3,0$ Hz) para H-25 e H-27 e em δ 7,22 ppm ($J=3,0$ Hz) para H-24 e H-28, simples em δ 0,57 ppm para o grupo hidroxila da cadeia do ácido copálico.

No espectro de RMN de ^{13}C do ACD13B (Tabela 10) foi possível reconhecer os pontos em comparação com a literatura sendo identificados 33 sinais caracterizados pelo espectro DEPT : sete carbonos metílicos, oito metilênicos, dez metínicos e oito quaternários.

Tabela 10: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C da reação de esterificação do ác. 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B).

$n^{o13}\text{C}$	ACD13B (Esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno)				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 1,3	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 1,2	DEPT
1	2,33m	2,32ddd	37,9	37,0	CH2
2	-	-	27,8	27,7	CH2
3	3,5m	3,27dd	80,7	78,8	CH
4	-	-	39,1	39,1	C
5	1,11m	1,08dd	54,6	54,6	CH
6	1,54m	-	23,6	23,9	CH2
7	1,13m; 2,41m	1,16td; 2,40ddd	38,2	38,1	CH2
8	-	-	147,2	147,6	C
9	0,72m	1,36dd	56,1	55,8	CH
10	-	-	39,2	39,4	C
11	1,51s	1,48qd	21,0	21,6	CH2
12	1,40m; 1,28s	-	39,9	39,9	CH2
13	-	-	154,1	163,7	C
14	5,69s	5,64sl	115,0	114,8	CH
15	-	-	170,8	171,1	C
16	2,18s	2,17d	19,4	19,2	CH3
17	4,47dd; 4,88s	4,51sl; 4,86sl	107,1	106,8	CH2
18	1,02s	1,01s	26,4	28,3	CH3
19	0,80s	0,78s	25,3	15,4	CH3
20	0,71s	0,70s	14,2	14,5	CH3
21	-	-	174,4	174,5	C
22	3,69d	3,69m	45,6	45,6	CH
23	-	-	138,2	138,2	C
24	7,22d	7,22d	129,7	129,2	CH
25	7,10d	7,10d	127,6	127,3	CH
26	-	-	140,5	140,3	C
27	7,10d	7,10d	127,3	127,3	CH
28	7,22d	7,22d	129,2	129,2	CH
29	1,51d	1,50d	18,4	18,1	CH3
30	2,46d	2,46d	45,0	45,0	CH2
31	1,85m	-	30,2	30,2	CH
32	0,88s	0,91s	22,4	22,3	CH3
33	0,90s	0,91s	22,3	22,3	CH3
OH	-	-	-	-	-

Fonte: (1) VARGAS, 2013; (2) THEODULOZ *et al.*, 2015; (3) ROMERO, 2007.

SUBSTANCIAS_SEMISINTETICAS_2 #1271-1280 RT: 22.27-22.40 AV: 10 NL: 1,14E4
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-]

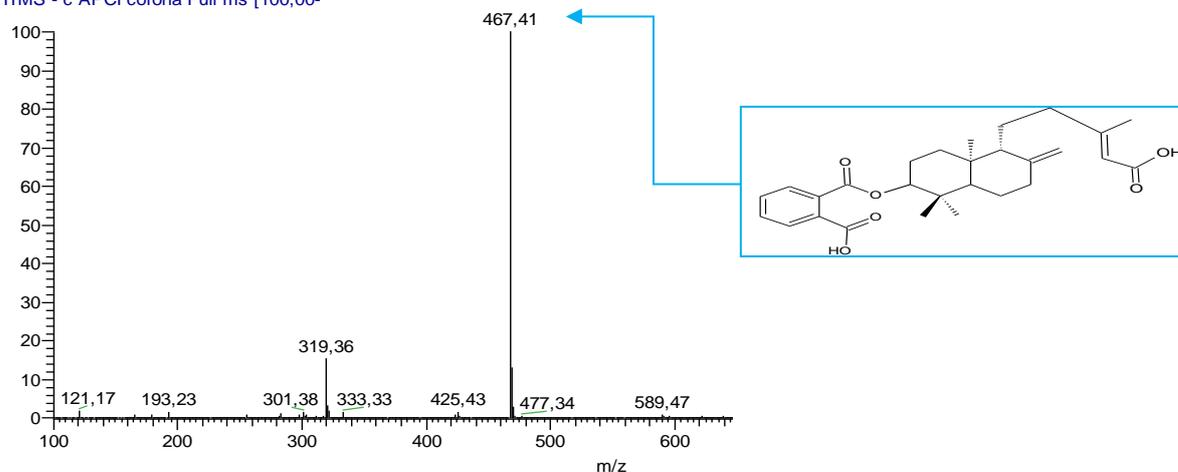


Figura 26: MS-APCI do derivado do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico (ACD51), modo negativo (PM: 467,41).

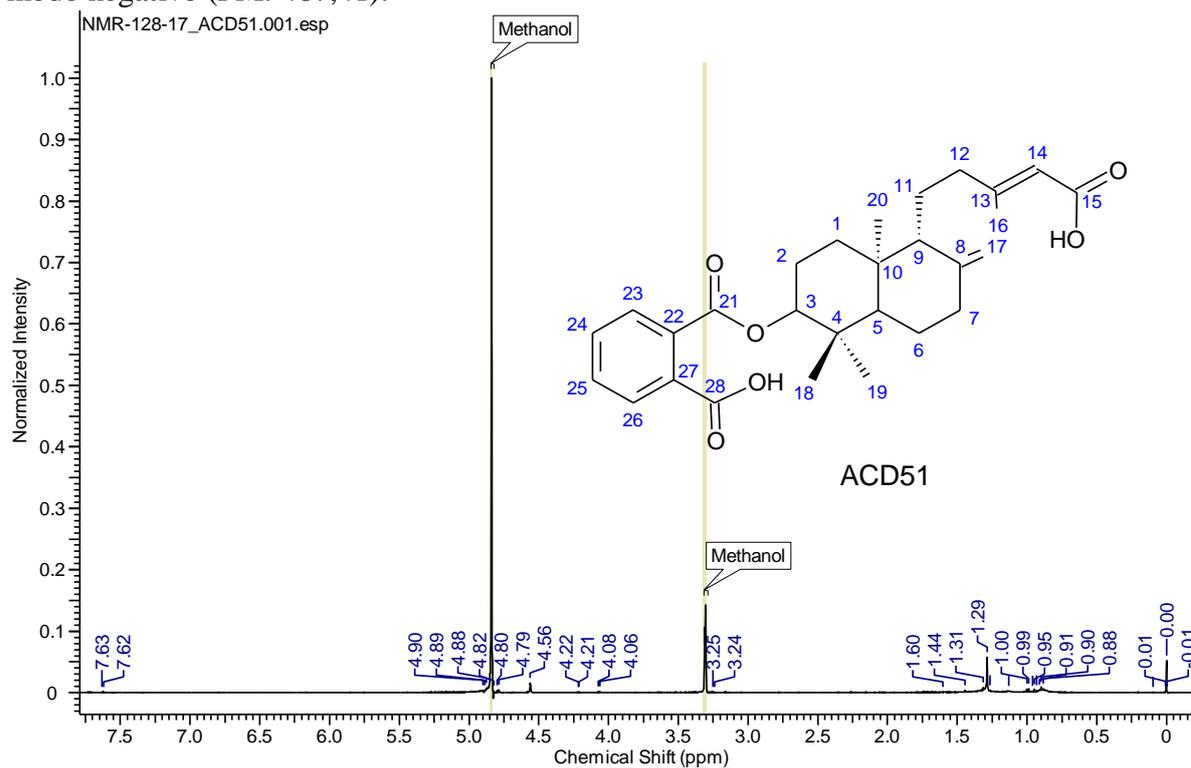


Figura 27: Espectro de RMN de ¹H da reação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico. (CD₃OD; 500 MHz).

Após análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 27) da reação de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com o anidrido ftálico ACD51, observou-se os seguintes sinais: Multipletos com deslocamentos em $\delta 7,61$, $\delta 7,63$ e $\delta 7,61$ atribuídos aos hidrogênios olefínicos das posições H-26, H-25 e H-24, respectivamente, bem como simpletos com deslocamentos em $\delta 0,88$, $\delta 0,90$ e $\delta 1,00$ atribuídos aos hidrogênios metílicos das posições H-20, H-19 e H-18. Simpleto com deslocamento em $\delta 4,56$ e multipletos com deslocamento em $\delta 4,80$ atribuídos ao hidrogênio da dupla exocíclica na posição H-17 e também um multipletos com deslocamento em $\delta 2,26$ atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-12. Simpleto com deslocamento em $\delta 1,44$ atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-11 e multipletos com deslocamento em $\delta 1,31$ atribuído ao hidrogênio metínico da posição H-9 e simpleto com deslocamento em $\delta 1,13$ atribuído ao hidrogênio metilênico da posição H-7. Um simpleto com deslocamento em $\delta 0,99$ atribuído ao hidrogênio metínico da posição H-5 e um multipletos com deslocamento em $\delta 3,20$ atribuído ao hidrogênio metínico da posição H-3.

No espectro de RMN de ^{13}C do ACD51 (Tabela 11) foi possível reconhecer os pontos em comparação com a literatura sendo identificados 28 sinais caracterizados pelo espectro DEPT : quatro carbonos metílicos, sete metilênicos, oito metínicos e nove quaternários.

Tabela 11: Dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C da reação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico.

$n^{13}\text{C}$	ACD51 (R. de esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico anidrido ftálico)				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ Ref. 1,2	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ Ref. 1,2	DEPT
1	-	1,93-2,03m	35,2	37,0	CH2
2	-	--	29,1	27,7	CH2
3	3,20m	3,27dd	74,1	78,8	CH
4	-	--	40,8	39,1	C
5	0,99s	1,09dd	54,3	54,6	CH
6	-	--	23,5	23,9	CH2
7	1,13s	1,17td; 2,41m	38,1	38,1	CH2
8	-	--	157,6	147,6	C
9	1,31m	1,35-1,45m	60,2	55,8	CH
10	-	--	39,5	39,4	C
11	1,44s	1,48qd	22,4	21,6	CH2
12	2,26m	2,27-2,37m	42,7	39,9	CH2
13	-	--	162,9	163,7	C
14	4,89m	5,68d	113,3	114,8	CH
15	-	--	172,3	171,1	C
16	2,26m	2,17d	18,1	19,2	CH3
17	4,56s; 4,80m	4,52s; 4,83m	105,4	106,8	CH2
18	1,00s	1,01s	29,3	28,3	CH3
19	0,90s	0,78s	14,1	15,4	CH3
20	0,88s	0,70s	13,1	14,5	CH3
21	-	-	165,1	165,9	C
22	-	-	130,7	130,7	C
23	7,72m	8,06d	129,3	129,5	CH
24	7,61m	7,43t	128,5	128,2	CH
25	7,63m	7,55t	131,0	132,7	CH
26	7,61m	7,43t	128,9	128,2	CH
27	-	-	129,8	129,5	C
28	-	-	176,2	176,7	C

Fonte: (1) VARGAS, 2013; (2) SANTOS, 2010.

Tabela 12: Fórmula geral e peso molecular dos derivados semissintéticos.

Reações	Fórmula Geral	Peso Molecular
Derivado epóxido do ácido copálico (ACD4)	$C_{20}H_{32}O_3$	320,4
Esterificação do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B)	$C_{33}H_{48}O_4$	508,7
Acilação do ácido 3-hidróxi-copálico com anidrido ftálico(ACD51)	$C_{28}H_{36}O_6$	486,6

5.4 Atividades farmacológicas:

5.4.1 Efeito dos bioativos semissintetizados sobre a viabilidade de células THP-1

Foi avaliada a capacidade das moléculas geradas derivadas de diterpenos na viabilidade de células THP-1, ou seja, se estes apresentavam potencial citotóxico. Observou-se que o derivado esterificado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B) apresenta potencial citotóxico capaz de inibir a proliferação de mais de 50% das células nas concentrações de 10 e 20 μM . O ibuprofeno foi citotóxico, de forma estatisticamente significativa na concentração de 20 μM em relação ao grupo controle, sendo procedido o teste para efeito comparativo. Os demais derivados não apresentaram efeito citotóxico (Figura 28).

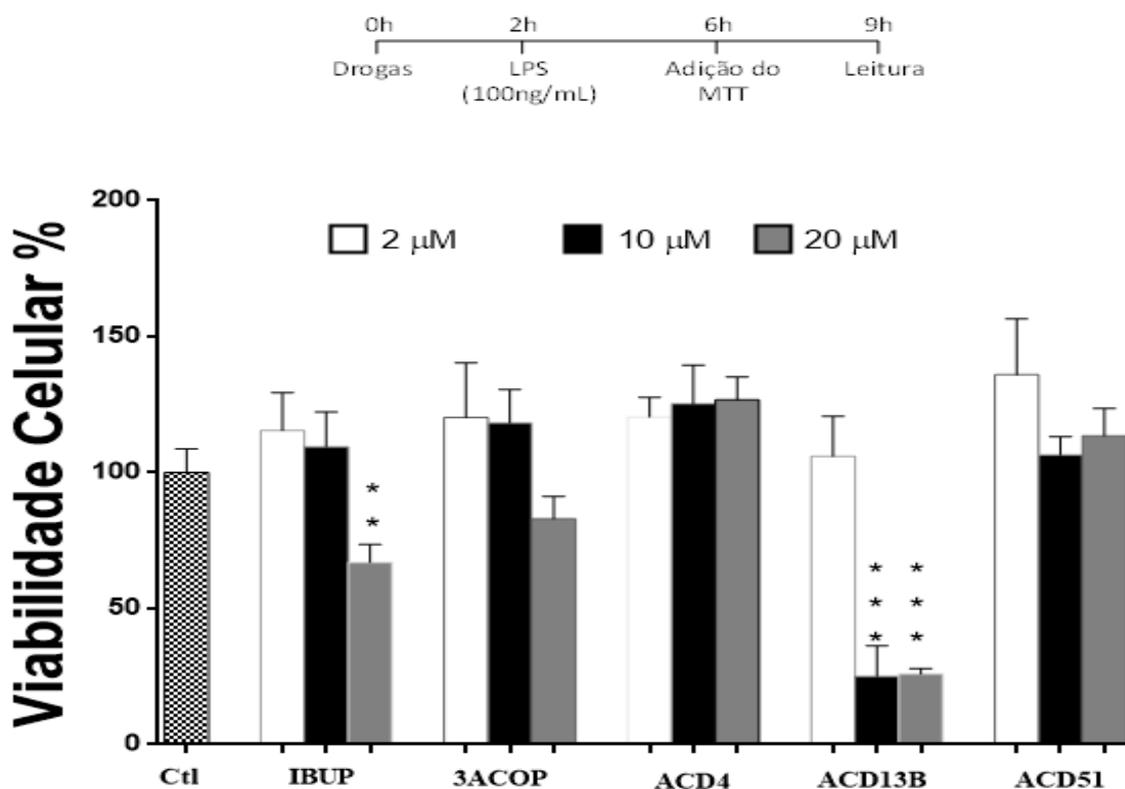


Figura 28: Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e pré-tratamento com os bioativos em diferentes concentrações (2, 10 e 20 μM). Os dados estão expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle (média \pm DPM). ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle. *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA).

A citotoxicidade do ACD13B em concentrações de 10 e 20 μM aqui observada, pode ter influência do ibuprofeno acoplado à estrutura do ácido 3-hidróxi-copálico conforme preceitua o trabalho de SCHENELL, *et al.*, (2009) onde o mesmo em concentrações elevadas (acima de 15 $\mu\text{g/mL}$) se mostra citotóxico em células de peixe (PLHC-1), pois as mesmas reduzem a capacidade de metabolização da resazurina.

Em outro procedimento experimental referido por CURCI *et al.*, (2017), o objetivo da reação de síntese foi exatamente aumentar o potencial citotóxico da *kiteplatina* adicionando-se o ibuprofeno (testado de 0,01 à 800 μM), pois a droga, possivelmente, promove o transporte e acúmulo de complexos em células tumorais, aumentando sua lipofilicidade, resultando em atividade citotóxica potencializada na molécula produzida. Além disso, o uso do *ibuprofeno* conjugado à *kiteplatina* pôde garantir ação anti-inflamatória mediada pela inibição de enzimas que são expressas em tumores.

Por outro lado, BIGNON *et al.*, (2017) propõe que o *ibuprofeno* e o *cetoprofeno* potencializam a morte celular se expostos à luz solar (raios UV), pois caso sejam fotodissociados, podem gerar radicais livres potencialmente reativos como a formação de agregados metaestáveis e oxigênio singlete promovendo danos ao DNA, levando-nos a concluir por redução da viabilidade celular em células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama).

Com relação à citotoxicidade causada em células THP-1, observou-se citotoxicidade causada pelo ibuprofeno em procedimento experimental realizado por JURIMA-ROMET *et al.*, (1994) onde os anti-inflamatórios não-esteroidais testados apresentaram citotoxicidade em cultura de hepatócitos sendo o *diflunisal* mais citotóxico.

Além disso, em pesquisa realizada por MIYASHITA *et al.*, (2014), a reatividade química do acil-glicuronídeo (AG) está associada a propriedades tóxicas de drogas que contém moléculas de ácido carboxílico. Acil-glicuronídeos foram investigados por reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa em tempo real, e as viabilidades de células CD3 +, CD14 + e CD19 + foram medidas por citometria de fluxo. A viabilidade das células CD14+ estava reduzida.

As demais substâncias semissintetizadas (ACD4 e ACD51) não demonstraram citotoxicidade em células THP-1, aqui testadas, nas concentrações (2, 10 e 20 μ M), e também o mesmo resultado com o ácido 3-hidróxi-copálico, em células tumorais, foi referido por VARGAS *et al.*, (2015) como baixa citotoxicidade.

Utilizado o óleo bruto de *Copaifera multijuga* por VEIGA-JR *et al.*, (2007), onde os ácidos copálico, 3-acetóxi-copálico e 3-hidróxi-copálico são majoritários, é possível concluir-se por 96,56% e 100% de viabilidade celular nas concentrações 5 μ g/mL e 50 μ g/mL, respectivamente, em macrófagos intra-peritoniais de ratos por ensaio-MTT.

Com isso, os resultados das substâncias com baixa citotoxicidade, corroboram, possivelmente, com a propriedade cicatrizante atribuída ao óleo de copaíba, em trabalho de VEIGA-JR & PINTO (2002).

5.4.2 Efeito de bioativos semissintetizados na produção de TNF- α em células THP-1 ativadas por LPS.

Após realização do ensaio de viabilidade foi também realizada a análise dos níveis de TNF- α no sobrenadante das células tratadas com os diferentes compostos sintetizados. Dentre os compostos analisados o que apresentou maior efeito inibitório sobre a liberação de TNF- α foi o ACD13B, o qual foi posteriormente escolhido para as demais atividades farmacológicas estudadas. Dessa forma, o derivado esterificado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno

(ACD13B), figura 29, apresentou inibição de TNF- α significativa, quando comparado ao grupo controle.

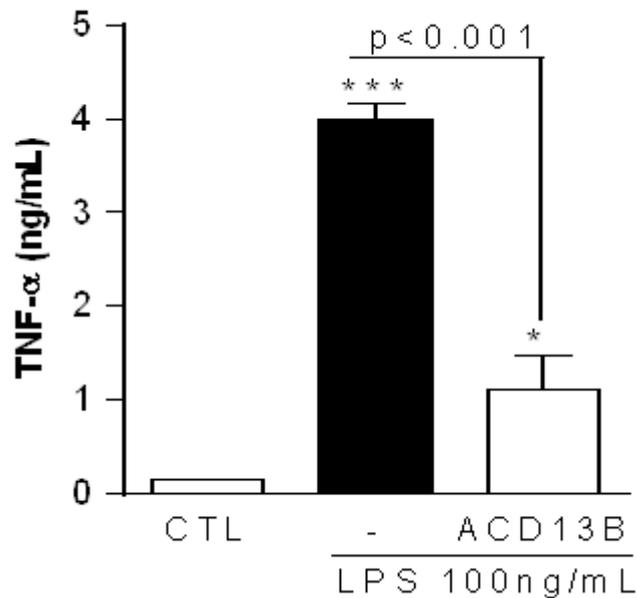


Figura 29: Inibição do TNF- α em células THP-1 ativadas com LPS e tratadas com ACD13B (derivado esterificado do ácido 3-hidroxi-copálico com ibuprofeno) na concentração 2 μ M.

A redução do TNF- α pelo ibuprofeno (250 mg/Kg) tem sido referida em pesquisa realizada, onde o mesmo atenuou o recrutamento de neutrófilos e macrófagos secretores de mieloperoxidase em hepatócitos de camundongos, bem como atenuação do TNF- α sérico, depleção de glutathiona, alterações mitocondriais, apoptose hepática por combinação de inibição em COX-1 e COX-2 (CAZANAVE *et al.*, 2008).

Em investigação científica realizada por SAYIN *et al.*, (2013) pesquisou-se o efeito do *ibuprofeno* em concentrações de 25, 50 e 100 mcg/mL, na redução, em percentual, de citocinas inflamatórias como interferon- γ , interleucina-4, interleucina-17 e TNF- α em células

mononucleares do sangue periférico. O *ibuprofeno* causou significativa redução da produção de TNF- α , em torno de 30%, em todas as doses testadas tendo como método o ensaio *elispot*.

Além disso, em outra pesquisa publicada por GUO & FENG, (2017) o *ibuprofeno* (5 mg/Kg) administrado intra-ventrículo cerebral de ratos recém-nascidos, produziu significativa redução de TNF- α no tecido do hipocampo após ativação com LPS e, avaliados, posteriormente, por *blotting*.

No que diz respeito a atividade inibitória de TNF- α por diterpenos obtidos do óleo de copaíba em trabalho realizado por GELMINI *et al.*, 2013, no qual foi avaliada a atividade anti-inflamatória de uma fração purificada de *C. langsdorffi* contendo ácidos diterpênicos, observou-se que a fração diterpênica inibiu TNF- α nas concentrações 1 e 10 μ M em células THP-1, não demonstrando inibição em outras concentrações.

Em relato da capacidade de outros diterpenos exercerem atividade de redução da produção de TNF- α , CASTRILLO *et al.*, (2001), pesquisou a influência de seis diterpenos, sendo três cauranos (foliol, linearol, ácido *ent*-Kaur-16-en-19-óico), e três clerodanos (teucrina A, acetilgnaphalin e eriocephalin), tendo os diterpenos cauranos demonstrado atividade inibitória sobre TNF- α .

Dessa forma, a inibição do TNF- α é assegurada pelas duas substâncias que dão origem ao produto e mantida pela nova substância (ACD13B).

5.4.3 Efeito do ACD13B em modelo de pleurisia realizada em camundongos Balb-C

Neste estudo, foi avaliada a atividade anti-inflamatória do derivado ACD13B (Figura 30) em modelo de pleurisia induzida por LPS em virtude da substância apresentar efeito anti-TNF *in vitro* e a necessidade de sabermos se a mesma apresentava efeito *in vivo*. O ACD13B reduziu em torno de 40% o total de leucócitos e em até 50% o número de mononucleares no modelo estudado. A via IP (intra-peritoneal) foi escolhida inicialmente a fim de se verificar a resposta preliminar por motivo da quantidade de substância no momento do experimento. A dose utilizada pela via IP foi de 100 mg/Kg.

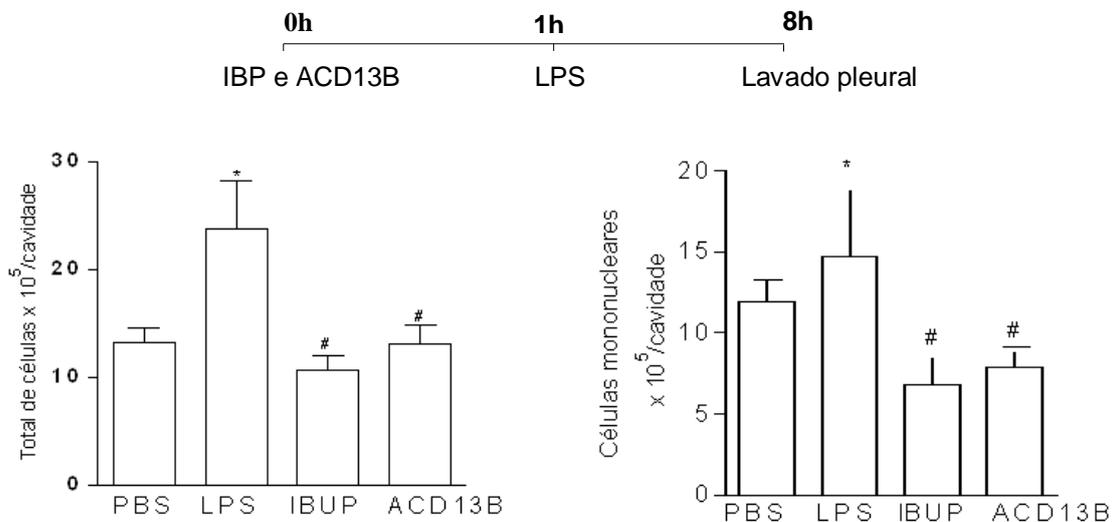


Figura 30: Efeito do ACD13B em modelo de pleurisia induzida por LPS. Um grupo de animais foi tratado com Ibuprofeno (IBUP) para fins comparativos. Camundongos BALB/c machos foram tratados com ACD13B ou IBUP (100 mg/Kg, i.p.) e após 1h foram injetados com PBS ou LPS (250 ng/cavidade, i.pl.) e as células que migraram para a cavidade pleural foram coletadas após 7h de estímulo inflamatório. As células do lavado pleural foram processadas para contagem total e diferencial. Os resultados são expressos como o número de células/cavidade e são mostrados como média \pm DPM de 4 animais do grupo PBS e 5 animais nos demais grupos. * $P < 0,05$ quando comparado com animais injetados com PBS e # $p < 0.05$ quando comparado com animais desafiados com LPS.

Em modelo de pleurisia induzida por anti-BSA (800 µg), alguns anti-inflamatórios não-esteroidais foram testados em ratos *wistar*, dentre eles o *ibuprofeno* (proporção de 1:2 de tween:ibuprofeno), e administrado 1 mL dessa proporção, por gavagem. As inibições da produção de exsudato ocorreram na ordem de 18 à 37 %, e de leucócitos, de 28 à 43%, ambos, na cavidade pleural (SMITH *et al.*, 1983).

O tratamento de ratos com ibuprofeno nas doses de 17,5 à 35 mg/Kg, v.o., utilizando-se modelo de pleurisia induzida por LPS, promoveu declínio de 51 à 55% do volume de exsudato pleural, bem como do número de leucócitos da cavidade, em torno de 35%, uma vez que o número de mononucleares permaneceu inalterado com o intervalo de doses supracitadas, segundo WISNIEWSKI-REBECCA *et al.*, (2015).

O trabalho de PIERRI *et al.*, (2017) refere que o extrato etanólico de *Casearia sylvestris*, contendo 27,4 % de diterpenos clerodanos demonstrou efeito redutor do número de leucócitos em modelo de pleurisia induzida por LPS na concentração de 300 e 500 mg/Kg.

VEIGA-JR *et al.*, (2007) demonstrou em procedimento experimental de modelo de pleurisia induzida por *zymosan* que o óleo de *Copaifera multijuga* (100 mg/Kg), contendo majoritariamente ácido copálico e seus derivados: 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico apresentou efeito inibitório do total de leucócitos em torno de 45%.

Por conseguinte, o ACD13B teve efeito inibitório confirmado em modelo de pleurisia induzida por LPS, onde o teste estatístico refere significativa redução do número de neutrófilos e mononucleares corroborando dados da literatura a respeito do ibuprofeno indicando por conseguinte, que a introdução do ibuprofeno na posição 3 do ácido 3-hidróxi-copálico não alterou significativamente a atividade anti-inflamatória observada para o fármaco.

Ainda, com o objetivo de verificar possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória foi avaliada a inibição da expressão protéica da p-IkB α , onde constatou-se inibição da pIkB- α pelo ácido 3-hidróxi-copálico e ACD13B comparados ao *ibuprofeno* (figura 31). Outros ensaios de *western blotting* poderão ser importantes a fim de se investigar demais vias de sinalização que o derivado ACD13B possa ter efeito inibitório.

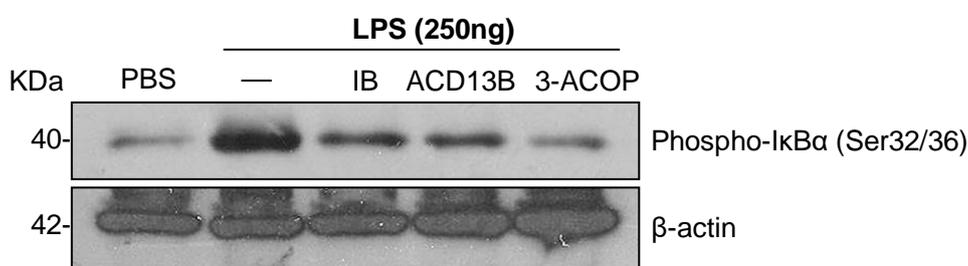


Figura 31: Efeito do derivado do ácido 3-hidróxi-copálico com ibuprofeno (ACD13B) e ácido 3-hidróxi-copálico (3-ACOP) sobre a expressão molécula-chave da via de sinalização da inflamação (p-IkB α) no ensaio dose-resposta em células THP-1 ativadas com LPS. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti- β -actina. Extratos celulares foram coletados após término do ensaio *in vivo* e processados para *western blotting*. Blots são representativos de *pools* de células extraídas de quatro poços.

As proteínas inibitórias da família I κ B descritas em células de mamíferos são de três tipos: pI κ B- α , pI κ B- β e pI κ B- ϵ , que funcionam inibindo a sequência de localização nuclear do NF- κ B à região específica do DNA. Durante a resposta inflamatória, a ativação de receptor específico na superfície celular leva a ativação de IKK que fosforila pI κ B- α nos resíduos de serina 32 e 36 levando a sua ubiquitinação e consequente translocação de NF- κ B à região do DNA responsável pela produção de citocinas inflamatórias (YAMAMOTO & GAYNOR, 2001).

Em trabalho proposto por GUPTA *et al.*, (2010), o NF- κ B é via de sinalização inflamatória potencial na intervenção farmacológica onde a ubiquitinação e a degradação do inibidor da pIKB- α promovem ativação através de translocação nuclear das subunidades p50-p65 do NF- κ B seguido por fosforilação, acetilação e metilação da p65, ligação ao DNA e transcrição gênica sendo que muitos agentes podem inibi-los, como proteínas quinases, fosfatases, proteassomas e ubiquitinação e, as etapas de acetilação, metilação e ligação ao DNA foram identificadas como inibidores de NF- κ B, e dentre as várias moléculas estudadas na referida inibição está o *ibuprofeno*.

Em pesquisa realizada PALAYOOR *et al.*, 1999, houve inibição constitutiva de NF- κ B e da pIKB- α pelo agente anti-inflamatório ibuprofeno em células PC-3 e DU-145 (câncer de próstata) de forma que o ACD13B em comparação ao ibuprofeno tem melhor ação de inibição.

Um novo diterpeno labdano ácido 15-nor-14-oxolabda-8e 13-dien-19-óico foi isolado de extratos alcoólicos de *Thuja orientalis*, tendo atenuado a atividade transcricional induzida por LPS de NF- κ B pela inibição da pIKB- α (KIM *et al.*, 2013). Nesta sequência, uma série de 11 diterpenos do tipo labdano com vários padrões de substituição foram testados quanto a potencial atividade anti-inflamatória. Dois derivados produzidos foram selecionados para avaliar sua influência em alvos relevantes para a regulação da resposta inflamatória tendo efeito inibitório do TNF- α em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, com IC50 na faixa de 1-10 μ M. O exame dos efeitos desses diterpenóides na sinalização do NF- κ B demonstra atividade inibitória da fosforilação da pIKB- α , impedindo sua degradação e a translocação nuclear da subunidade NF- κ B p65 (GIRÓN *et al.*, 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios realizados no presente estudo do ACD13B, sugerem, segundo o ensaio de expressão protéica, potenciais aplicações terapêuticas na regulação da resposta inflamatória pelas vias relacionadas a proteína I κ B- α . Contudo, outras vias inflamatórias não podem ser descartadas e poderão ser futuramente estudadas como mecanismos de ação propostos para este novo protótipo anti-inflamatório.

5.4.4 Ensaio de gastrotoxicidade

O ACD13B foi avaliado quanto à possibilidade ulcerogênica, em termos de índice de úlcera e comparado ao ibuprofeno. Os resultados obtidos nos estudos dos animais sacrificados 1, 2 e 4 horas após a ação da substância, revelaram segurança em relação à mucosa gástrica de camundongos Balb-C comparados ao ibuprofeno (Figuras 32 e 33). A substância demonstrou resultado satisfatório, em relação à gastroproteção, uma vez que nenhuma lesão macroscópica da mucosa do estômago foi verificada em camundongos balb/c após os períodos padronizados o que não foi observado nos animais tratados com o ibuprofeno.

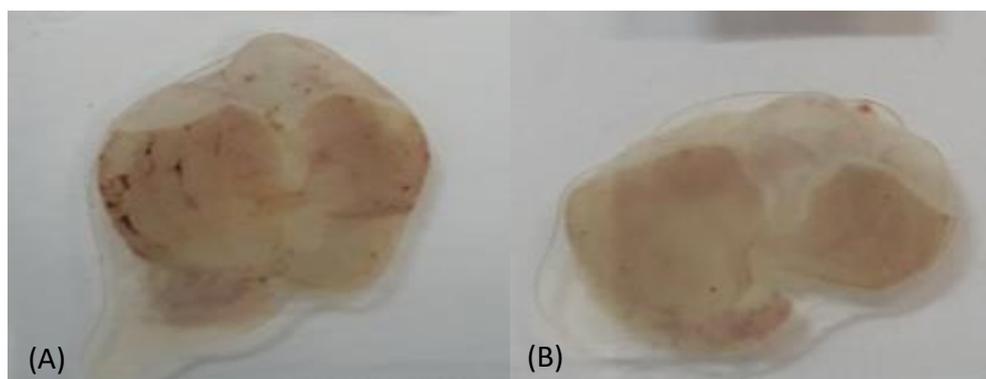


Figura 32: Fotomicrografias (aumento de 10x) (A) Grupo tratado com o ibuprofeno 4h, (B) Grupo tratado com ACD13B 4h. Tecidos de estômago de camundongos. Macroscopicamente, não foram observadas lesões em (B). As lesões foram medidas usando um sistema computadorizado.

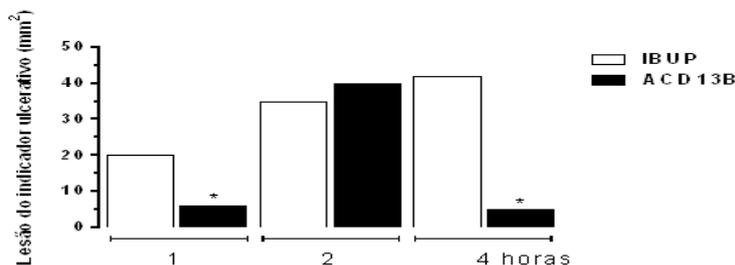


Figura 33: Efeito do derivado éster ACD13B (300 mg/Kg) em comparação com o IBUP (ibuprofeno-300 mg/Kg) no modelo de gastrotoxicidade em camundongos balb-C. Três (03) grupos animais tratados com IBUP (ibuprofeno) e três (03) grupos tratados com ACD13B foram sacrificados após 1, 2 e 4 horas para análise macroscópica. * Medidas de lesões (mm) de ACD13B em comparação com IBUP em 1, 2 e 4 h.

Em virtude do conhecido efeito gastrotóxico causado pelo ibuprofeno, este modelo fez-se necessário afim de verificar uma possível proteção ou diminuição do mesmo no derivado sintetizado. Analisando os resultados obtidos ficou claramente evidenciado que os efeitos gastrotóxicos do *ibuprofeno* foram suprimidos pela adição do ácido 3-hidróxi-copálico na molécula.

Outros autores, também relataram menor gastrotoxicidade em derivados do ibuprofeno, mesmo tendo relação com a menor seletividade pela COX-2. A pesquisa realizada por PÉREZ *et al.*, 2017, preceitua que derivados do ibuprofeno com ação anti-oxidante e anti-inflamatória, refere resultados semelhantes, onde o efeito gastro-tóxico esteve reduzido em em ratos *wistar* em virtude de alteração estrutural na molécula do *ibuprofeno*.

Em outro trabalho desenvolvido por LOLLI *et al.*, (2001) em ratos *wistar*, da série de anti-inflamatórios não-esteroidais selecionados, dentre eles o ibuprofeno, produziu-se derivados com propriedades anti-inflamatórias, anti-agregantes e anti-ulcerogênicas em virtude da supressão do grupamento carboxílico, o que parece ser o principal componente irritativo da mucosa gástrica.

Os resultados de inibição da gastrotoxicidade aqui obtidos, corroboram com HEGAZY & ALI, (2012), onde um conjunto de ésteres do *ibuprofeno* e do *ácido mefenâmico* sintetizados por condensação dos ácidos com as bases de Schiff correspondentes, teve a finalidade de reduzir o efeito gastrotóxico do *ibuprofeno* e do *ácido mefenâmico* em ratos, promovendo modificação da função carboxílica, tendo sido constatado que os derivados produzidos não apresentaram ação ulcerogênica.

Com os resultados observados na literatura, a redução da toxicidade se deve a formação de substância éster, onde o derivado ACD13B foi, definitivamente, menos irritante à mucosa gástrica em camundongos balb/C que o *ibuprofeno* quando estudado nas mesmas condições. Estes achados tornam-se importantes, uma vez que não se observou diminuição da atividade anti-inflamatória estudada com menor efeito gastrotóxico o que pode ser um fator importante para a utilização desta nova molécula na terapêutica.

5.4.5 Docking

O objetivo do *docking* foi determinar o modo de interação entre as substâncias semissintetizadas nesta tese, através da análise da estrutura do complexo intermolecular enzima-ligante, das potenciais ligações hidrofílicas e hidrofóbicas entre a proteína alvo e seus ligantes estimados pelo *docking*. Além disso, a compreensão detalhada das interações entre as enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) e a substância estudada, fornece informações úteis no que diz respeito a relação estrutura-atividade. Este estudo de ancoragem molecular utilizou o ACD13B submetido a estudos com 2 (duas) estruturas cristalográficas, COX-1 (Figura 34) e COX-2 (Figura 35), selecionadas no *Protein Data Bank* (PDB).

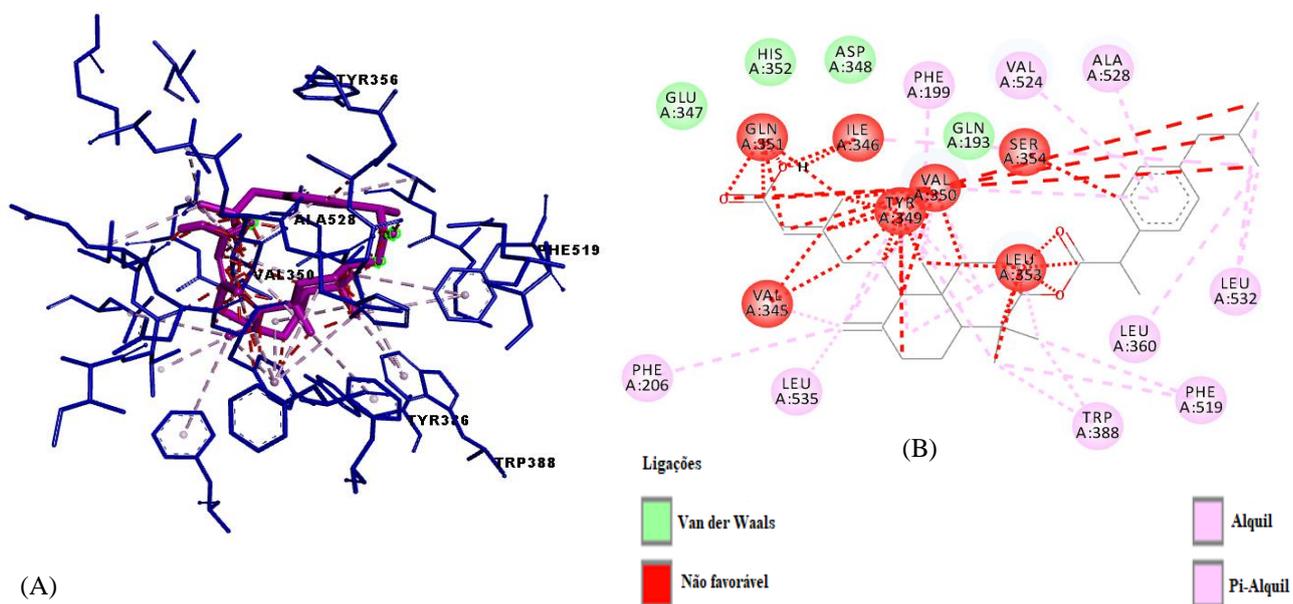


Figura 34: (A) Estudo de modelagem molecular gerada em COX-2 (PDB: 4PH9) para ACD13B, composto representado em roxo; local de ligação do ligante para o composto ancorado. (B) Representação dimensional do composto ACD13B no sítio ativo na COX-2. RMSD: 1,77.

O estudo de *docking* do ligante ACD13B realizado em COX-2 (PDB: 4PH9), demonstrou interação por ligações de Wan der Waals em GLU A:347, HIS A:352, ASP A:348, GLN A:193, interações alquil e pi-alquil em PHE A:199, VAL A:524, ALA A:528, LEU A:532, LEU A:360, PHE A:519, TRP A:388, LEU A:535, PHE A:206 e ligações não-favoráveis em GLN A:351, ILE A:346, TYR A:349, VAL A:350, SER A:354, LEU A:353 e VAL A:345 com predominância de interações hidrofóbicas.(Figura 41). RMSD COX-2: 1,77.

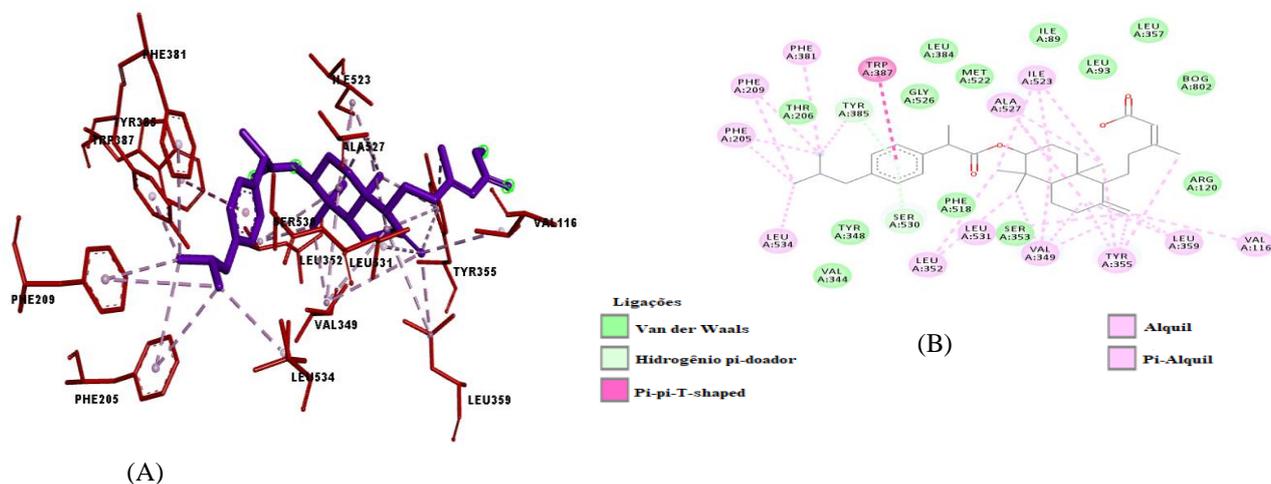


Figura 35: (A) Estudo de modelagem molecular gerado em COX-1 (PDB:1EQG) para ACD13B, composto representado em azul escuro; local de ligação do ligante para o composto ancorado. (B) Representação dimensional do composto ACD13B no local ativo da COX-1. RMSD: 0,57.

O docking do ACD13B em COX-1 revelou interações de Wan der Waals em THR A:206, GLY A: 526, LEU A:384, MET A:522, ILE A:89, LEU A:93, LEU A:357, BOG A:802, ARG A:120, SER A:353, PHA A:518, TYR A:348, VAL A:344, ligação de hidrogênio pi-doador em TYR A:385 e SER A:530 com ligações alquil e pi-alquil em PHE A:209, PHE A:381, ALA A:527, ILE A:523, VAL A:116, LEU A:359, TYR A:355, VAL A:349, LEU A:531, LEU A:352, LEU A:534 e PHE A:205 e ligação pi-pi-T-shaped em TRP A:387 com predominância de interações hidrofóbicas. (Figura 42). RMSD: 0,57.

Em estudo de modelagem molecular proposto por GUNDOGDU-HIZLIATES *et al.*, (2014) em derivados do ibuprofeno, os resultados obtidos referem interação dos inibidores com ARG120 através de forte ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas especialmente em TYR A:355, não tendo o ACD13B demonstrado ligações favoráveis em virtude do tamanho de sua estrutura, o que refere a regra de Lipinski onde o tamanho da cadeia pode dificultar a interação em ligantes COX-2, porém em COX-1 a referida estrutura apresentou interações tal como encontrado em docking do trabalho referido, especialmente em ARG A:120 sendo o que caracteriza o ACD13B como inibidor não-seletivo da COX-2.

Neste sentido, em procedimento experimental de derivados do ácido ursólico, sintetizou-se com alta afinidade pela COX-2, fornecendo informações para o desenvolvimento de novos inibidores da COX-2 como agentes anti-inflamatórios, tendo sido encontrado em

seus derivados, maioria de ligações hidrofóbicas como se apresenta em modelagem molecular do ACD13B em COX-2 e COX-1 (WEI *et al.*, 2018).

Com relação a menor seletividade pela COX-2, PÉREZ *et al.*, (2017), estudando derivados do ibuprofeno com ação anti-oxidante e anti-inflamatória, referem no estudo computacional interações em TYR-385 e resíduo de bolsa lateral em SER-530, tendo o ACD13B, em virtude da estrutura molecular de grande tamanho, referido algumas ligações desfavoráveis em COX-2, porém com semelhança de interações hidrofóbicas obtidas neste trabalho.

Dessa forma, os resultados sugerem a não-seletividade em COX-2, já que em COX-1 a interação em ARG A:120 ocorre de maneira a inibir consideravelmente a atividade da enzima.

Portanto, estudos enzimáticos de *docking* em COX-2 em derivados do ibuprofeno, são realizados afim de buscar informações que possam desenvolver drogas inéditas e seguras sempre com a possibilidade de elucidação das interações no sítio ativo da estrutura cristalográfica.

6. CONCLUSÕES

- No presente trabalho isolou-se ácidos diterpênicos dos óleos-resina de *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata* sendo utilizado métodos de coluna com KOH à 10%, coluna aberta em vários gradientes de hexano e acetato de etila. Os ácidos obtidos da *C. multijuga* foram: ácido copálico, ácido 3-acetóxi-copálico e ácido 3-hidróxi-copálico e da *C. reticulata* obteve-se ácido hardwíckiico.
- Por reações de semissíntese, a partir do ácido copálico, obteve-se o derivado epóxido (ACD4). As substâncias obtidas a partir do ácido 3-hidróxi-copálico foram: derivado esterificado com ibuprofeno (ACD13B) e derivado por acilação com anidrido ftálico (ACD51), os quais foram caracterizados quimicamente por métodos espectrométricos.
- Nos ensaios de atividade farmacológica, o ACD13B, apresentou efeito citotóxico e redução significativa na viabilidade de células THP-1 em concentrações 10 e 20 μM . Os demais derivados, ACD4 e ACD51, não demonstraram citotoxicidade nas concentrações testadas nesta linhagem.
- O ACD13B foi capaz de produzir efeito inibitório sobre a produção de TNF- α *in vitro* em células THP-1 estimuladas por LPS.
- Quando administrado em camundongos com pleurisia estimulada por LPS, o ACD13B reduziu o número total de leucócitos no líquido pleural, bem como o número de células mononucleares. A inibição da migração pode ter ocorrido por inibição da proteína ikB- α demonstrada por ensaio de *western blot*.
- O ACD13B mostrou menor gastrotoxicidade, quando comparado ao ibuprofeno, em camundongos balb/C.

- Em estudo de modelagem molecular o ACD13B demonstrou interações hidrofóbicas em COX-2 e interações fortes em COX-1 o que demonstra a não seletividade da substância pela COX-2.
- De acordo com estes achados, o derivado do ibuprofeno com o ácido 3-hidróxi copálico pode apresentar-se como um protótipo de fármaco anti-inflamatório, o qual pode ser explorado do ponto de vista de suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas em futuros estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSIO, S. R., TIRAPELLI, C. R., COUTINHO, S. T., DE OLIVEIRA, D. C. R., DE OLIVEIRA, A. M., & DA COSTA, F. B. (2004). Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(11), 1407–1413. <https://doi.org/10.1211/0022357044715>
- AMBROSIO, S. R., TIRAPELLI, C. R., DA COSTA, F. B., & DE OLIVEIRA, A. M. (2006). Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sciences*, 79(10), 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.05.015>
- ARAÚJO JÚNIOR, F. A. DE, BRAZ, M. N., ROCHA NETO, O. G. DA, COSTA, F. D., & BRITO, M. V. H. (2005). Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20(1), 93–99. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502005000100013>
- AZIZIAN, H., MOUSAVI, Z., FARAJI, H., TAJIK, M., BAGHERZADEH, K., BAYAT, P.; ALMASIRAD, A. (2016). Arylhydrazone derivatives of naproxen as new analgesic and anti-inflammatory agents: Design, synthesis and molecular docking studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 67, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.05.009>
- BANDEIRA, MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA; OLIVEIRA, MARIA RITA BRANCINI DE; PIZZOLITTO, ANTONIO CARLOS; BENATTI NETO, CARLOS; JORGE NETO, J. (1999). Estudo farmacológico preliminar de copaifera multijuga (óleo de copaíba)/Study preliminary pharmacologic of the copaifera multijuga (copaiba oil). *JBC j. Bras. Clin. Estet. Odontol*, 3(16).
- BARBOSA, K. . (2007). *Óleo-resina de Copaifera multijuga Hayne (LEG-CAESALPINOIDEAE): Produção e análise química na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM.*
- BARRETO, A. G., BISCAIA, E. C., DA VEIGA, V. F., PINTO, A. C., DE CARVALHAES, S. F., & MACIEL, M. A. M. (2005). Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (Copaifera multijuga) e da sacaca (Croton cajucara). *Quimica Nova*, 28(4), 719–722. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400028>
- BAUTISTA, E., FRAGOSO-SERRANO, M., ORTIZ-PASTRANA, N., TOSCANO, R. A., & ORTEGA, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.08.007>
- BEGUM, S., NIZAMI, S. S., MAHMOOD, U., MASOOD, S., IFTIKHAR, S., & SAIED, S. (2018). In-vitro evaluation and in-silico studies applied on newly synthesized amide derivatives of N-phthaloylglycine as Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*, 74, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.04.003>
- BIAVATTI, M. W., DOSSIN, D., DESCHAMPS, F. C., & LIMA, M. P. (2006). Análises de óleos-resinas de copaíba: contribuição par ao seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), 230–235. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200017>
- BIGNON, E., MARAZZI, M., BESANCENOT, V., GATTUSO, H., DROUOT, G.,

- MORELL, C., ... MONARI, A. (2017). Ibuprofen and ketoprofen potentiate UVA-induced cell death by a photosensitization process. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09406-8>
- BRACCHITTA, G., CATALFO, A., MARTINEAU, S., SAGE, E., DE GUIDI, G., & GIRARD, P. M. (2013). Investigation of the phototoxicity and cytotoxicity of naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in human fibroblasts. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12(5), 911–922. <https://doi.org/10.1039/c3pp25326k>
- BUTLER, M. S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 25(3), 475. <https://doi.org/10.1039/b514294f>
- BUTLER, M. S., & BUSS, A. D. (2006). Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.012>
- CASCON, V., & GILBERT, B. (2000). Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, 55(7), 773–778. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00284-3)
- CASTRILLO, A.; HERAS, B. L.; HORTELANO, S.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; BOSCA, L. (2001). Inhibition of the Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Pathway by Tetracyclic Kaurene Diterpenes in Macrophages. specific effects on NF- κ B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of erk and p38 map. *The Journal of Biological Chemistry*, 19(11), 15854–15860.
- CAVALCANTI, B. C., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BURBANO, R. R., SILVEIRA, E. R., CUNHA, K. M. A., PESSOA, C. (2006). Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.011>
- CAZANAVE S, VADROT N, TINEL M, BERSON A, LETTÉRON P, LAROSCHE I, DESCATOIRE V, FELDMANN G, ROBIN MA, P. D. (2008). Ibuprofen administration attenuates serum TNF- α levels, hepatic glutathione depletion, hepatic apoptosis and mouse mortality after Fas stimulation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 231(3), 336–43.
- CHEN, L., QIU, W., TANG, J., WANG, Z. F., & HE, S. Y. (2011). Synthesis and bioactivity of novel nitric oxide-releasing ursolic acid derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 22(4), 413–416. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2010.10.036>
- COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A., FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B., CUNHA, K. M. A., PESSOA, C., RAO, V. S. N. (2002). The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*, 40(8), 1231–1234. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00128-9)
- CUNHA, K. M. DE ALENCAR; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F.A; GRAMOSIA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth Muscle Relaxant Effect of Kaurenoic Acid, a Diterpene from *Copaifera langsdorffii* on Rat Uterus in vitro. **Phytother. Res**, p. 5, 2003.
- CURCI, A., DENORA, N., IACOBAZZI, R. M., DITARANTO, N., HOESCHELE, J. D., MARGIOTTA, N., & NATILE, G. (2017). Synthesis, characterization, and in vitro cytotoxicity of a Kiteplatin-Ibuprofen Pt(IV) prodrug. *Inorganica Chimica Acta*, 472, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.019>
- CURIO M, JACONE H, PERRUT J, PINTO AC, FILHO VF, S. R. (2009). Acute effect of

Copaifera reticulata Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *J Pharm Pharmacol*, 61(8), 1105–10.

DE ALENCAR CUNHA, K. M., PAIVA, L. A. F., SANTOS, F. A., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R., & RAO, V. S. N. (2003). Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. *Phytotherapy Research*, 17(4), 320–324. <https://doi.org/10.1002/ptr.1133>

DEWICK, PAUL M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*.

DOS SANTOS, C. B. R., DA SILVA RAMOS, R., ORTIZ, B. L. S., DA SILVA, G. M., GIULIATTI, S., BALDERAS-LOPEZ, J. L., CARVALHO, J. C. T. (2018). Oil from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog.: A traditional anti-inflammatory. Study combining in vivo and in silico. *Journal of Ethnopharmacology*, 222(April), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.041>

ERICKSON, J. A., JALAIE, M., ROBERTSON, D. H., LEWIS, R. A., & VIETH, M. (2004). Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy, 45–55. <https://doi.org/10.1021/jm030209y>

ERTAS, A., OZTURK, M., BOGA, M., TOPCU, G., FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S. (2007). Antioxidant and anticholinesterases acaricidal activity of an oleoresinous extract from *copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 147, 50–54.

ESPINOZA-HICKS, J. C., CAMACHO-DÁVILA, A., & NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. (2011). Structural modification of organic compounds by chemical synthesis to develop new antimicrobials. *Science Ag*, 169–175.

FERNANDES, F. DE F., & FREITAS, E. DE P. S. (2007). Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 147(1–2), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.035>

FRANCISCO, S. . (2005). Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. *Femina*, 22(2), 89–93.

GELMINI, F., BERETTA, G., ANSELMI, C., CENTINI, M., MAGNI, P., RUSCICA, M., MAFFEI FACINO, R. (2013). GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.021>

GERIS, R., DA SILVA, I. G., DA SILVA, H. H. G., BARISON, A., RODRIGUES-FILHO, E., & FERREIRA, A. G. (2008). Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 50(1), 25–28. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100006>

GIL, F., DE LA IGLESIA, R., MENDOZA, L., GONZÁLEZ, B., & WILKENS, M. (2006). Soil bacteria are differentially affected by the resin of the medicinal plant *Pseudognaphalium vira vira* and its main component kaurenoic acid. *Microbial Ecology*, 52(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9107-z>

GIRÓN, N., TRAVÉS, P. G., RODRÍGUEZ, B., LÓPEZ-FONTAL, R., BOSCA, L.,

- HORTELANO, S., & DE, B. (2008). Supression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids ☆, 228, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.006>
- GOMES, N. DE M., REZENDE, C. DE M., FONTES, S. P., HOVELL, A. M. C., LANDGRAF, R. G., MATHEUS, M. E., FERNANDES, P. D. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.033>
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., URIBE-FIGUEROA, G., HIDALGO-FIGUEROA, S., MARTÍNEZ, A. L., DÉCIGA-CAMPOS, M., & NAVARRETE-VAZQUEZ, G. (2018). Synthesis and antinociceptive evaluation of bioisosteres and hybrids of naproxen, ibuprofen and paracetamol. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101(February), 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.122>
- GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R., CAVALCANTI, B.C., FERREIRA, J.R., DE OLIVEIRA, F.S., RAO, V.S., COSTA-LOTUFO, L.V., DE MORAES, M.O., PESSOA, C. (2010). Chemistry and pharmacology of *Copaifera langsdorffii* Desf.: an overviewNo Title. *Drug Plants I. Studium Press LLC, Houston*, 235–260.
- GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E. . (2005). Volatiles constituintes of *Copaifera langsdorffii* from the brazilian northeast. *J. Essent. Oil Res*, 17, 130.
- GRAMOSA, N. . (2001). *Estudo químico-farmacológico de Copaifera langsdorffii Desf. (Leguminosae)*.No Title. Universidade Federal do Ceará.
- GUNDOGDU-HIZLIATES, C., ALYURUK, H., GOCMENTURK, M., ERGUN, Y., & CAVAS, L. (2014). Synthesis of new ibuprofen derivatives with their in silico and in vitro cyclooxygenase-2 inhibitions. *Bioorganic Chemistry*, 52, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.10.002>
- GUO, P., & FENG, Y. Y. (2017). Anti-inflammatory effects of kaempferol, myricetin, fisetin and ibuprofen in neonatal rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(8), 1819–1826. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i8.10>
- GUPTA, S. C., SUNDARAM, C., REUTER, S., & AGGARWAL, B. B. (2010). Inhibiting NF-??B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10–12), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>
- HEGAZY, G. H., & ALI, H. I. (2012). Design, synthesis, biological evaluation, and comparative Cox1 and Cox2 docking of p-substituted benzylidenamino phenyl esters of ibuprofenic and mefenamic acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(3), 1259–1270. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.030>
- HERRERO-JÁUREGUI, C., CASADO, M. A., DAS GRAÇAS BICHARA ZOGHBI, M., & CÉLIA MARTINS-DA-SILVA, R. (2011). Chemical variability of *Copaifera reticulata* ducke oleoresin. *Chemistry and Biodiversity*, 8(4), 674–685. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000258>
- HIEN & WHITE. (1993). Qinghaosu. *Lancet*, 341, 603–608.
- IDIPPILY, N. D., ZHENG, Q., GAN, C., QUAMINE, A., ASHCRAFT, M. M., ZHONG, B., & SU, B. (2017). Copalic acid analogs down-regulate androgen receptor and inhibit small chaperone protein. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(11), 2292–2295.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.046>

IMAMURA, P. M.; IDE R. M.; M. P. DEL C.; SANTOS, C.; NOGUEIRA R. T.; CARVALHO, J. E.; LUNARDI, I.; SORIANO; GIACOMINI, R. A. (2005). Atividade Biológica de alguns ácidos diterpênicos naturais e de seus derivados semissintéticos. *Revista Fitos, 1*.

JOY, B.; REMANI, P. (2008). Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. *Medicinal Chemistry Research, 17*(2), 345–355.

JOY, M., & CHAKRABORTY, K. (2018). Specialized oxygenated heterocyclics from *Villorita cyprinoides* with cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitory properties. *Food Research International, 106*(December 2017), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.066>

JURIMA-ROMET, M.; CRAWFORD, K.; HUANG, H. S. (1994). COMPARATIVE CYTOTOXICITY OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES. *Toxicology in Vitro, 8*(1), 55–66.

KASHIF L, J. C.; M., FABIOLA; RAMÍREZ-MORENO K.; NOGUEDA-TORRES, E.; PAZ-GONZ,B.; RIVERA, A. D. (2018). European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis , molecular docking and biological evaluation of novel phthaloyl derivatives of 3-amino-3-aryl propionic acids as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans -sialidase, *156*, 252–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.005>

KERZARE, D., CHIKHALE, R., BANSODE, R., AMNERKAR, N., KARODIA, N., PARADKAR, A., & KHEDEKAR, P. (2016). Design, synthesis, pharmacological evaluation and molecular docking studies of substituted oxadiazolyl-2-oxoindolinylidene propane hydrazide derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 27*(11), 1998–2010. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160090>

KIM, T., LI, H., WU, Q., JIN, H., & RYU, J. (2013). A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. *Journal of Ethnopharmacology, 146*(3), 760–767. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.02.001>

KOBAYASHI, C., FONTANIVE, T. O., ENZWEILER, B. G., DE BONA, L. R., MASSONI, T., APEL, M. A., SUYENAGA, E. S. (2011). Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. *Pharmaceutical Biology, 49*(3), 306–313. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.515595>

LANZOTTI, V., BARILE, E., SCAMBIA, G., & FERLINI, C. (2015). Cyparissins A and B, jatrophone diterpenes from *Euphorbia cyparissias* as Pgp inhibitors and cytotoxic agents against ovarian cancer cell lines. *Fitoterapia, 104*, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.012>

LEANDRO, L. M., DE SOUSA VARGAS, F., BARBOSA, P. C. S., NEVES, J. K. O., DA SILVA, J. A., & DA VEIGA-JUNIOR, V. F. (2012). Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules, 17*(4), 3866–3889. <https://doi.org/10.3390/molecules17043866>

LIMA, S. R. M., VEIGA, V. F., CHRISTO, H. B., PINTO, A. C., & FERNANDES, P. D. (2003). In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne

- and its Fractions. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1048–1053. <https://doi.org/10.1002/ptr.1295>
- LOLLI, M. L., CENA, C., MEDANA, C., LAZZARATO, L., MORINI, G., CORUZZI, G., GASCO, A. (2001). A New Class of Ibuprofen Derivatives with Reduced Gastrotoxicity, (Chart 2), 3463–3468. <https://doi.org/10.1021/jm0108799>
- MACIEL, HERMELINDA PENHA FREIRE; GOUVÊA, CIBELE MARLI CAÇÃO PAIVA; MARANGONI, SÉRGIO; PASTORE, G. M. (2007). Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, 30(5).
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, V. F., GRYNBERG, N. F., & ECHEVARRIA, A. (2002). Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3), 429–438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>
- MAGALHÃES, C. S. DE, BARBOSA, H. J. C., & DARDENNE, L. E. (2004). A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem, 610, 605–610.
- MAHAJAN, J.R. & FERREIRA, G. A. L. (1971). New diterpenoids from Copaiba oil. *An. Acad. Bras. Cienc*, 43, 611–613.
- MATOS, P. M., MAHONEY, B., CHAN, Y., DAY, D. P., CABRAL, M. M. W., MARTINS, C. H. G., HELENO, V. C. G. (2015). New non-toxic semi-synthetic derivatives from natural diterpenes displaying anti-tuberculosis activity. *Molecules*, 20(10), 18264–18278. <https://doi.org/10.3390/molecules201018264>
- MAURYA, R., RAVI, M., SINGH, S., & YADAV, P. P. (2012). A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83(2), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.007>
- MCCARTHY, R. DUTHIE D. (1962). A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids. *Journal of Lipid Research*, 3(1), 117–119.
- MEDEIROS, R.S.; VIEIRA, G. (2008). Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. *Forest Ecology and Management*, 256, 282–288.
- MIYASHITA, T., KIMURA, K., FUKAMI, T., NAKAJIMA, M., & YOKOI, T. (2014). Evaluation and mechanistic analysis of the cytotoxicity of the acyl glucuronide of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054478>
- MIYAZAWA, M.; H. SHIMAMURA, S. N. (1995). Antimutagenic activity of (+) – polyalthic acid from vitex rotundifolia. *J. Agric. Food Chem*, 43, 3012–3015.
- MONTI, H., TILIACOS, N., & FAURE, R. (1996). Two diterpenoids from copaiba oil. *Phytochemistry*, 42(6), 1653–1656. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00162-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00162-8)
- MORIMOTO Y, OSHIMA S, HARA H, S. T. (1991). No TitleEffects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn J Pharmacol*, 57, 495–505.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- NA, M. K., OH, W. K., KIM, Y. H., CAI, X. F., KIM, S. H., KIM, B. Y., & AHN, J. S. (2006). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from *Acanthopanax koreanum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(11), 3061–3064.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.02.053>

NEWMAN, GM & CRAGG, N. D.(2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 Years. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s.Natural>

OHSAKI, A., YANA, L. T., ITOA, S., EDATSUGIB, H., IWATAB, D., KOMODAA, Y., & SCIENCE, B. (1994). The Isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant , *Copaifera Langsdorfii* Abstract: An extremely potent antitumor *neo*-clerodane diterpene was isolated from the oleoresin of De, 2889–2892.

OHTA, K. NAWAMAKI, T. (1978). (+)-Polyalthic acid, a repellent against a sea snail *Monodonta neritoides*. *Faculty of Agriculture*, (ISSN: 0002-1369. [1978]).

OKUYAMA E, NISHIMURA S, Y. M. (1991). Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, Feb;39(2), 405–407.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E. . (1998). Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorfii* oleo-resin on experimetal gastric ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacology*, 62, 73–78.

PAIVA, L. A. F., GURGEL, L. A., CAMPOS, A. R., SILVEIRA, E. R., & RAO, V. S. N. (2004a). Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorfii* in rats. *Life Sciences*, 75(16), 1979–1987. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.011>

PAIVA, L. A. F., GURGEL, L. A., DE SOUSA, E. T., SILVEIRA, E. R., SILVA, R. M., SANTOS, F. A., & RAO, V. S. N. (2004b). Protective effect of *Copaifera langsdorfii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.028>

PALAYOOR, S. T. et al. Constitutive activation of I k B kinase a and NF- k B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. 1999.

PANTAROTTO, H. (1996). Síntese do triterpeno bicíclico ent-a-polipodatetraeno: Confirmação da configuração absoluta do produto natural. *Instituto de Química*.

PEDRIALI, CARLA APARECIDA; FERNANDES, ADJACI UCHOA; POLAKIEWICZ, L., & BRONISLAW., EANDRA DE C. B. (2008). The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Química Nova*, 31, 2147–2151.

PÉREZ, D. J., DÍAZ-REVAL, M. I., OBLEDO-BENICIO, F., ZAKAI, U. I., GÓMEZ-SANDOVAL, Z., RAZO-HERNÁNDEZ, R. S., RAMOS-ORGANILLO, Á. (2017). Silicon containing ibuprofen derivatives with antioxidant and anti-inflammatory activities: An *in vivo* and *in silico* study. *European Journal of Pharmacology*, 814(July), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.07.046>

PIERRI, E. G., CASTRO, R. C., VIZIOLI, E. O., FERREIRA, C. M. R., CAVALHEIRO, A. J., TININIS, A. G., ... SANTOS, A. G. (2017). Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*, 27, 495–501.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. . (1991). Separation of Acidic Components of *Vellozia flavicans* by silica gel/potassium hydroxide

chromatography. *Phytochemical Analysis*, 8, 14–17.

PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA-JR., V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O. A. C. (2000). Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 11(4), 355–360.

PINTO, A. C., BRAGA, W. F., REZENDE, C. M., GARRIDO, F. M. S., VEIGA, V. F., BERGTER, L., ANTUNES, O. A. C. (2000). Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11(4), 355–360. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000400005>

RAINSFORD, K. D. (2005). Introduction - The coxib controversies. *Inflammopharmacology*, 13(4), 331–341. <https://doi.org/10.1163/156856005774415628>

RATHINAVEL, T, AMMASHI, S., & MUTHUSAMY, G. (2018). Screening of anti-inflammatory phytochemicals from *Crateva adansonii* leaf extracts and its validation by in silico modeling. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.004>

REYES-TREJO, B., SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E., BECERRA-GARCÍA, A. A., CEDILLO-PORTUGAL, E., CASTILLO-HENKEL, C., & ARRIETA, J. (2008). Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(7), 931–936. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.7.0016>

RIBEIRO, D. A., MACÊDO, D. G., OLIVEIRA, L. G. S., SARAIVA, M. E., OLIVEIRA, S. F., SOUZA, M. M. A., & MENEZES, I. R. A. (2014). Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(4), 912–930. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. ., WADT, P. G. S., & WADT, L. H. O. (2004). EMPRAPA - Copaíba : Ecologia e Produção de Óleo-Resina. *Documento 91*.

ROMERO, A. L. (2007). *Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos*. Universidade Federal de Campinas.

ROMERO, A. L., BAPTISTELLA, L. H. B., & IMAMURA, P. M. (2009). Absolute configuration of some dinorlabdanes from the copaiba oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1036–1040. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600006>

SANTOS, R. F. (2010). *AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS SINTÉTICOS DO β -SITÓSTEROL E TRITERPENOS*. Universidade Federal da Bahia.

SARIGOL, D., UZGOREN-BARAN, A., TEL, B. C., SOMUNCUOGLU, E. I., KAZKAYASI, I., OZADALI-SARI, K., TOZKOPARAN, B. (2015). Novel thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles derived from naproxen with analgesic/anti-inflammatory properties: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(10), 2518–2528. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.049>

SAYIN, NURTEN; UYGUN, DILARA; SALLAKÇI, NILGUN; FILIZ, SERKAN; YEGIN, O. (2013). Inhibitory Effects of Acetylsalicylic Acid and Ibuprofen on Interleukin-17 Production. *Turk J Immunol*, 1(2), 42–46.

- SCHENELL, SABINE; KAWANO, ATSUSHI; PORTE, CINTA; LEE, LUCY; BOLS, N. (2009). Effects of Ibuprofen on the Viability and Proliferation of Rainbow Trout Liver Cell Lines and Potential Problems and Interactions in Effects Assessment. *Environmental Toxicology*, 24(2), 157–165. <https://doi.org/DOI.10.1002/tox>
- SCUDELLER, VERIDIANA VIZONI; ROSA, ALEXANDRE LISBOA; BARBOSA, K. DE S. (2007). Viabilidade econômica da extração do Óleo-resina de Copaifera multijuga Hayne na amazônia central. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5 n. 1, 753–755.
- SENO, F. S., LUSARCZYK, S., MATKOWSKI, A., PEREZ-GARRIDO, A., GIRON-RODRIGUEZ, F., CERON-CARRASCO, J. P., ORHAN, I. E. (2017). Selective *in vitro* and *in silico* butyrylcholinesterase inhibitory activity of diterpenes and rosmarinic acid isolated from *Perovskia atriplicifolia* Benth. and *Salvia glutinosa* L. *Phytochemistry*, 133, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.10.012>
- SHRIVASTAVA SK, SRIVASTAVA P, BANDRESH R, TRIPATHI PN, TRIPATHI A. Design, synthesis, and biological evaluation of some novel indolizine derivatives as dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor for anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017;25(16):4424–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.027>
- SILVA E.S.; MATHIAS, C.S.; LIMA, M.C.F.; VEIGA-JR.; V.F.; RODRIGUES, D.P.; CLEMENT, C. (2012). Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. *Pesq. Agropec. Bras*, 47(11), 1621–1628.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (2004). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*.
- SINGH, S., PANDEY, V. P., NAAZ, H., SINGH, P., & DWIVEDI, U. N. (2013). Structural modeling and simulation studies of human cyclooxygenase (COX) isozymes with selected terpenes: Implications in drug designing and development. *Computers in Biology and Medicine*, 43(6), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2013.02.019>
- SMITH, R. J., IDEN, S. S., & ROHLOFF, N. A. (1983). A Model of Arthus Pharmacologic Pleurisy : Modulation by Various and Therapeutic Agents, 24–34.
- SOUSA, L. P., CARMO, A. F., REZENDE, B. M., LOPES, F., SILVA, D. M., ALESSANDRI, A. L., PINHO, V. (2009). Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-κB. *Biochemical Pharmacology*, 78(4), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.030>
- SOUSA, L. P., LOPES, F., SILVA, D. M., TAVARES, L. P., VIEIRA, A. T., REZENDE, B. M., TEIXEIRA, M. M. (2010). PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- B-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(5), 895–904. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809540>
- SOUZA, A. B., MARTINS, C. H. G., SOUZA, M. G. M., FURTADO, N. A. J. C., HELENO, V. C. G., SOUSA, J. P. B. DE, AMBRÓSIO, S. R. (2011). Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research*, 25(2), 215–220. <https://doi.org/10.1002/ptr.3244>
- SPANEVERELLO, R. A; VILA, A. J. (1994). 7- α -acetoxyhardwickiic acid: a furanoid clerodane. *Phytochemistry*, 35(2), 537–538.

- SPINSOLVE CARBON. Ibuprofen: example of benchtop NMR on small organic molecules. (2013).
- STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem*, 43, 14.
- SUGIMOTO, L. (2003). Óleo De Copaíba É Testado Em 9 Tipos De Câncer, 2003.
- TERAMOTO, R., & FUKUNISHI, H. (2007). Supervised Consensus Scoring for Docking and Virtual Screening, 526–534. <https://doi.org/10.1021/ci6004993>
- THEODULOZ, C., DELPORTE, C., VALENZUELA-BARRA, G., SILVA, X., CÁDIZ, S., BUSTAMANTE, F., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. (2015). Topical anti-inflammatory activity of new hybrid molecules of terpenes and synthetic drugs. *Molecules*, 20(6), 11219–11235. <https://doi.org/10.3390/molecules200611219>
- TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNANDEZ, B. V. (2002). Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Med*, 68, 808–812.
- UR REHMAN, T., KHAN, A. ULLAH, ABBAS, A., HUSSAIN, J., KHAN, F. U., STIEGLITZ, K., & ALI, S. (2018). Investigation of nepetolide as a novel lead compound: Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, anticancer, anti-inflammatory, analgesic activities and molecular docking evaluation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(3), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.019>
- VAGO JP, NOGUEIRA CR, TAVARES LP, SORIANI FM, LOPES F, RUSSO RC, PINHO V, TEIXEIRA MM, S. L. (2012). Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol.*, 92(2), 249–258.
- VALOTTO, C. F. B., DA SILVA, H. H. G., CAVASIN, G., GERIS, R., FILHO, E. R., & DA SILVA, I. G. (2011). Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *magonia pubescens* (Sapindaceae). *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 194–200. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000010>
- VARGAS, F. D. S., DE ALMEIDA, P. D. O., ARANHA, E. S. P., BOLETI, A. P. D. A., NEWTON, P., DE VASCONCELLOS, M. C., LIMA, E. S. (2015). Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. *Molecules*, 20(4), 6194–6210. <https://doi.org/10.3390/molecules20046194>
- VARGAS, F. DE S. (2013). *Atividades biológicas de terpenos de óleos de copaíba (Copaifera spp. – Fabaceae)*. Tese. Programa multi-institucional de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas-UFAM.
- VEIGA-JR, VALDIR F.; MACIEL, MARIA APARECIDA; PINTO, Â. C. (2005). PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Química Nova*, 28 (3), 519–528.
- VEIGA-JR., V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A. . (1997). Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, 20(6), 612–615.
- VEIGA, V. F., & PINTO, A. C. (2002). *Revisão*, 25(2), 273–286.

VEIGA, V. F., ROSAS, E. C., CARVALHO, M. V., HENRIQUES, M. G. M. O., & PINTO, A. C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005>

VEIGA V. F., ZUNINO L., CALIXTO J. B., PATITUCCI M.L., P. Â. (2006). The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58, 1405–1410.

WANG, Y. Y., GAO, Y. X., GAO, W., XU, Y., XU, Y. Z., WANG, Y. J., QIU, W. W. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of tricyclic diterpene derivatives as novel neuroprotective agents against ischemic brain injury. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.057>

WEI, Z. Y., CHI, K. Q., WANG, K. S., WU, J., LIU, L. P., & PIAO, H. R. (2018). Design, synthesis, evaluation, and molecular docking of ursolic acid derivatives containing a nitrogen heterocycle as anti-inflammatory agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 28(10), 1797–1803. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.021>

WISNIEWSKI-REBECCA, E. S., ROCHA, B. A., WIIRZLER, L. A. M., CUMAN, R. K. N., VELAZQUEZ-MARTINEZ, C. A., & BERSANI-AMADO, C. A. (2015). Synergistic effects of anethole and ibuprofen in acute inflammatory response. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.013>

WU, Y.C., HUNG, Y.C., CHANG, R.F., COSENTINO, M., WANG, H.K., LEE, K. . (1996). Identification of ent-16 β , 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.*, 59, 635–637.

YAMAMOTO, Y., & GAYNOR, R. B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer, 107(2), 135–142.

ZHANG Y. H., PENG H. Y., XIA G. H., WANG M. Y., H. Y. (2004). Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 937–942.

ZHAO, H., ZENG, G., ZHAO, S., XU, J., KONG, L., LI, Y., YANG, S. (2015). Cytotoxic labdane-type diterpenes from *Hedychium longipetalum* inhibiting production of nitric oxide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4572–4575. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.08.057>

ZOGHBI, M. D. B., MARTINS-DA-SILVA, R. C. V., & TRIGO, J. R. (2009). Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 403–404. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700203>

ZOGHBI, M. D. G. B., ANDRADE, E. H. A., MARTINS-DA-SILVA, R. C. V., & TRIGO, J. R. (2009). Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* ducke (leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 21(6), 501–503. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700228>

ANEXOS

26/05/2015

Gmail - Certificado CEUA



Flávio Almeida Amaral <dr.famaral@gmail.com>

Certificado CEUA

CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>
 Para: dr.famaral@gmail.com

26 de maio de 2015 10:07

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 83 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Triagem da inibição da liberação de TNF- α e atividade anti-inflamatória aguda de plantas brasileiras", que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2015. Este certificado espira-se em 26/05/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 83 / 2015, related to the Project entitled "Screening of TNF- α release inhibition and acute anti-inflammatory activity by Brazilian plants", under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 26/05/2015. This certificate expires in 26/05/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 26/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO-SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº **A1C58B0**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A1C58B0**
 Usuário: **Universidade Federal do Amazonas**
 CPF/CNPJ: **04.378.626/0001-97**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Copaifera multijuga

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE TERPENOS OBTIDOS DO ÓLEO DE COPAÍBA (Copaifera spp. – Fabaceae)**

Equipe

EMERSON SILVA LIMA	Universidade Federal do Amazonas
Valdir Florêncio da Veiga Júnior	Instituto Militar de Engenharia-IME
Fábio Cicalise de Souza	Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Resultados Obtidos

Outros resultados

Data do Cadastro: **17/10/2018 17:03:51**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:05** de **17/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**