

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

VANESSA GONÇALVES MEDEIROS

**ISOLAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DITERPENOS DO TIPO LABDANO**

GOVERNADOR VALADARES – MG

2019

Vanessa Gonçalves Medeiros

**ISOLAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DITERPENOS DO TIPO LABDANO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Luise Lang

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

GOVERNADOR VALADARES – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Medeiros, Vanessa Gonçalves.

Isolamento, síntese e avaliação da atividade biológica de diterpenos do tipo labdano / Vanessa Gonçalves Medeiros. -- 2019. 160 p.

Orientador: Karen Luise Lang

Coorientador: Rodrigo Ribeiro Resende

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2019.

1. diterpenos. 2. ácido copálico. 3. copaifera. I. Lang, Karen Luise, orient. II. Resende, Rodrigo Ribeiro, coorient. III. Título.

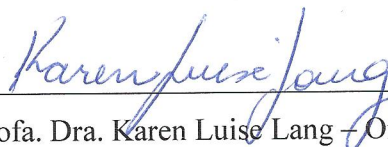
Vanessa Gonçalves Medeiros

**ISOLAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DITERPENOS DO TIPO LABDANO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 28 de março de 2019

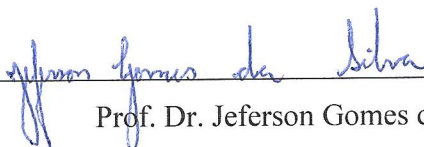
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Karen Luise Lang – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Rondinelle Gomes Pereira
Faculdade Pitágoras



Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha avó Doracy (*in memória*) que mesmo longe se fez presente pelos ensinamentos e lembranças. Aos meus pais Antônio e Rosemary, ao meu irmão Rodrigo, à minha cunhada Cristiane e à minha sobrinha Ellen, por estarem ao meu lado nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela capacidade de aprendizagem, pela força e por todas as pessoas incríveis que fizeram parte desse processo.

À minha orientadora Profa. Dra. Karen Luise Lang pela amizade e orientação, por ser um exemplo de profissional e pessoa. Agradeço por todos os conselhos e ensinamentos, pela dedicação ao meu trabalho e em especial, pela paciência, compreensão e por acreditar em mim. Muito obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo durante toda essa jornada, eu realmente serei eternamente grata por tudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Javier Durán da Universidade de Buenos Aires (UBA), Argentina. Por me receber prontamente em seu laboratório, disponibilizando todo material e suporte para que as modificações estruturais fossem realizadas, assim como as análises de Ressonância Magnética Nuclear. Agradeço também por toda atenção, paciência e ensinamento ao longo de minha estadia.

À Profa. Dra. Sandra Bertelli de Castro, do Departamento de Farmácia da UFJF/GV e sua aluna de pós-graduação Paloma Carvalho, por realizarem os ensaios de atividade citotóxica e anti-inflamatória.

Ao Prof. Dr. Fábio Alessandro Pieri do Departamento de Ciências Básicas da Vida da UFJF/GV e sua aluna de iniciação científica Mariane Parma, pelo suporte nos ensaios de atividade antibacteriana.

À Profa. Dra. Gabriela Cabrera, do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, pela realização das análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva e à Profa. Dra. Gabriella Freitas do Departamento de Farmácia da UFJF/GV por todos os ensinamentos e conselhos.

Aos meus amigos de mestrado, Áquila e Bolivar, pelo companheirismo nessa jornada, pelos desabafos, incentivos e risadas. É certo que com vocês a caminhada se tornou mais leve.

Aos meus amigos do laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos da UFJF/GV: Maiara Salvador, Ana Satlher, Alice Garcia, Daniel Melo e Beatriz. Obrigada por me auxiliarem nesse trabalho e pela amizade ao longo dos dias.

Aos meus companheiros e amigos de trabalho: Ana Maria, Bolivar, Letícia, Vanessa B., Juliano, Brenda, Cristhian Kele e Wtemberg. Obrigada por todo apoio, paciência e parceria. Vocês realmente fizeram parte dessa conquista.

Aos servidores Oyama e Joicy pela paciência e dedicação em responder as nossas dúvidas e solucionar os nossos problemas relacionados ao programa.

Ao meu irmão e amigo Rodrigo, por todo amor, apoio, compreensão e por estar sempre ao meu lado. Você é meu orgulho!

Aos meus pais, Antônio e Rosemary, por serem meu porto seguro e exemplos de caráter e bondade. Agradeço por estarem ao meu lado nesses dias de lutas. Amo vocês!

Aos meus avós, em especial a Vó Doracy (*in memória*) pelo amor e por todas as lembranças maravilhosas, foram muitos momentos de ensinamentos, histórias e risadas. Te amo, saudades.

À minha cunhada Cristiane, e em especial minha sobrinha Ellen, por alegrar meus dias.

À Clarisse, pelo companheirismo, cuidado e paciência. Obrigada por estar ao meu lado e me escutar nos dias difíceis.

Às minhas amigas, Naiana, Ludmila e Priscila pela compreensão e apoio.

À UFJF/GV, à FAPEMIG e ao PMBqBM pelo suporte financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!

RESUMO

Do tronco das árvores do gênero *Copaifera* (Leguminosae) é extraído um bálsamo designado como oleorresina (ORC). O oleorresina é constituído por uma fração volátil, rica em sesquiterpenos, e uma porção fixa, composta predominantemente por diterpenos. Dentre os diterpenos destaca-se o ácido copálico (**AC**), que está presente em todos os oleorresinas do gênero *Copaifera*, considerado como um biomarcador. Estudos já demonstraram que **AC** e outros diterpenos labdanos presentes em ORC possuem elevado potencial biológico, possuindo importante atividade antibacteriana, citotóxica e anti-inflamatória, sendo portanto protótipos promissores para o desenvolvimento de moléculas bioativas. Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu no isolamento de diterpenos labdanos do oleorresina de *Copaifera langsdorffii* e sua utilização como material de partida na obtenção de análogos semissintéticos para avaliação de suas potenciais atividades biológicas e estudo de relação estrutura atividade (SAR) preliminar. Quatro diterpenos do tipo labdano foram isolados do oleorresina de *C. langsdorffii*, sendo **COPI** descrito pela primeira vez para família Leguminosae. Dessas substâncias isoladas, três delas foram submetidas a modificações estruturais nas posições C-3 (oxidação), C-7 (oxidação alílica), C-15 (esterificação metílica) e C-17 (epoxidação), além de modificações inesperadas na posição C-13. Tais modificações permitiram a obtenção de nove diterpenos labdanos semissintéticos. Todas essas substâncias, tanto naturais quanto semissintéticas foram submetidas a avaliação de suas potenciais atividades biológicas. Com relação à atividade citotóxica, **AC** e seu derivado semissintético **VM-13** apresentaram os melhores resultados, com **VM-13** inibindo mais de 90% da viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma alveolar humano (A549), à 100 µM. As substâncias ácido 3-acetóxi-copálico (**AAC**, 50 µM), ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**, 100 µM) e **VM-11** (100 µM) reduziram entre 45 – 70% a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW264.7. Quanto à atividade antibacteriana, **AC** foi o que apresentou maior atividade frente a espécies do gênero *Streptococcus* e *Staphylococcus*, com valores de concentração inibitória mínima em torno de 30,45 µg/mL (100 µM). Os resultados obtidos permitiram sugerir unidades estruturais potencialmente importantes para as atividades biológicas avaliadas, como a presença de uma hidroxila em C-7 para atividade citotóxica; a presença de um éster ou ausência de ácido carboxílico em C-15 para atividade anti-inflamatória e a presença do ácido carboxílico para atividade antibacteriana.

Palavras-chaves: diterpenos, ácido copálico, *Copaifera*

ABSTRACT

From the tree trunk of the *Copaifera* (Leguminosae) genus is extracted a balm called oleoresin (ORC). The oleoresin consists of a volatile fraction, rich in sesquiterpenes, and a fixed portion, composed predominantly of diterpenes. Among the diterpenes, it is noteworthy the copalic acid (CA), which is present in all oleoresins from the *Copaifera* genus, being considered a biomarker. Studies have shown that CA and other diterpenes labdanes present in ORC have a high biological potential, possessing important antibacterial, cytotoxic and anti-inflammatory activity, being therefore promising prototypes for the development of bioactive molecules. Thus, the objective of the present work consisted in the isolation of the labdane diterpenes from the *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its use as starting material in the production of semi-synthetic analogs for the evaluation of their potential biological activities and preliminary study of structure-activity relationship (SAR). Four diterpenes of the labdane type were isolated from the oleoresin of *C. langsdorffii*, as COP1 being described for the first time for Leguminosae family. Of these isolated substances, three of them were subjected to structural modifications at the C-3 (oxidation), C-7 (allyl oxidation), C-15 (methyl esterification) and C-17 (epoxidation) positions, as well as unexpected modifications at C-13. These modifications allowed the obtainment of nine semi-synthetic labdane diterpenes. All these substances, both natural and semi-synthetic, were submitted to an evaluation of their potential biological activities. With regard to the cytotoxic activity, AC and its semisynthetic derivative VM-13 showed the best results, with VM-13 inhibiting more than 90% of the cellular viability of the human alveolar adenocarcinoma (A549) line, at 100 μ M. The substances 3-acetoxy-copalic acid (AAC, 50 μ M), 3-hydroxy-copalic acid (AHC, 100 μ M) and VM-11 (100 μ M) reduced in 45-70% nitric oxide (NO) production by macrophages RAW264.7. As for the antibacterial activity, AC showed the highest activity against species of the genus *Streptococcus* and *Staphylococcus*, with minimum inhibitory concentration values around 30.45 μ g/mL (100 μ M). The results allowed to suggest structural units potentially important for the biological activities evaluated, such as the presence of a hydroxyl in C-7 for cytotoxic activity; the presence of an ester or absence of a carboxylic acid in C-15 for anti-inflammatory activity and the presence of the carboxylic acid for antibacterial activity.

Keywords: diterpenes, copalic acid, *Copaifera*

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta de biossíntese de COP1 em <i>C. langsdorffii</i> .	76
Esquema 2: Epoxidação de AAC e AC .	77
Esquema 3: Esterificação do ácido carboxílico de AAC e AC .	81
Esquema 4: Oxidação de AAC e AC .	86
Esquema 5: Mecanismo proposto para oxidação alílica de VM-09 e VM-11 .	87
Esquema 6: Oxidação do ácido 3-hidróxi-copálico (AHC).	91
Esquema 7: Mecanismo de oxidação do álcool secundário de AHC a cetona.	94
Esquema 8: Mecanismo proposto de clivagem da cadeia lateral de AHC .	94
Esquema 9: Desproteção dos derivados esterificados de AAC e AHC .	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidades isopentânicas.	23
Figura 2: Subclasses de diterpenos com destaque para o esqueleto labdano.	24
Figura 3: Árvore de <i>Copaifera langsdorffii</i> .	25
Figura 4: Principais sesquiterpenos encontrados nos oleorresinas de <i>Copaifera sp.</i>	27
Figura 5: Principais diterpenos encontrados nos oleorresinas de <i>Copaifera sp.</i>	28
Figura 6: Estrutura molecular do ácido copálico.	33
Figura 7: Estrutura molecular do ácido 3-acetóxi-copálico (AAC) e ácido 3-hidróxi-copálico (AHC).	34
Figura 8: Estrutura molecular do copalato de metila.	35
Figura 9: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos do ácido copálico 2 e 3 .	37
Figura 10: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos do ácido copálico 4 , 5 e 6 .	40
Figura 11: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos 7 e 8 .	40
Figura 12: Delineamento experimental do ensaio de concentração inibitória mínima por microdiluição.	61
Figura 13: Análise cromatográfica das frações não-ácida, ácida e do oleorresina de <i>C. langsdorffii</i> .	63
Figura 14: Espectro no infravermelho (KBr) de AC .	65
Figura 15: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de AC .	66
Figura 16: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AC .	67
Figura 17: Espectro no infravermelho (KBr) de AC e AAC .	67
Figura 18: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de HSQC-dept e estrutura molecular de AAC .	68
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AAC , com destaque para H-17 e H-3.	69
Figura 20: Espectro no infravermelho (KBr) de AC e AHC .	70
Figura 21: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de AHC .	71
Figura 22: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AHC , com destaque para H-3.	71
Figura 23: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AC , AAC e AHC , com destaque para região de 4,6 – 4,4 ppm.	72

Figura 24: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de AC , AAC e AHC , com destaque para região de 173 – 170 ppm.	73
Figura 25: Espectro no infravermelho (KBr) de AC e COP1 .	74
Figura 26: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de COP1 .	74
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de COP1 .	75
Figura 28: Regiões dos diterpenos labdanos que sofreram modificações estruturais.	76
Figura 29: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de VM-07 .	78
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-07 , com destaque para os sinais referentes a H-17.	79
Figura 31: Espectro no infravermelho (KBr) de AAC e VM-03 .	79
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de VM-03 , com destaque para H-17 e H-3.	80
Figura 33: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AAC , VM-07 e VM-03 .	80
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-09 .	82
Figura 35: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de VM-09 .	83
Figura 36: Espectro no infravermelho (KBr) de AAC e VM-11 .	83
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de VM-11 .	84
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-11 .	84
Figura 39: Diterpeno espongiano e derivado hidroxilado.	85
Figura 40: Diterpeno labdano andrografolida e derivado hidroxilado.	86
Figura 41: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de HSQC-dept e estrutura molecular de VM-12 .	88
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-12 , com destaque para H-17, H-3 e H-7.	88
Figura 43: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AAC , VM-09 e VM-12 .	89
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-13 .	90
Figura 45: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de VM-13 .	90
Figura 46: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de VM-18 .	92
Figura 47: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de AHC e VM-18 .	92

Figura 48: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AHC e VM-18 .	93
Figura 49: Anti-histamínicos de primeira (hidroxizina) e segunda geração (cetirizina).	95
Figura 50: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AHC , VM-12 e VM-20 .	97
Figura 51: Espectro no infravermelho (KBr) de AC e VM-21 .	97
Figura 52: Estrutura do AC , VM-13 e VM-21 comparando os dados de RMN ^{13}C .	98
Figura 53: Diterpenos naturais e semissintéticos utilizados nos ensaios de atividades biológicas.	100
Figura 56: Viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos naturais.	104
Figura 57: Viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos semissintéticos.	104
Figura 58: Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos naturais.	106
Figura 59: Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos semissintéticos.	106
Figura 54: Viabilidade celular de células A549 tratadas com diterpenos naturais.	109
Figura 55: Viabilidade celular de células A549 tratadas com diterpenos semissintéticos.	109

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Experimentos realizados no presente trabalho.	43
Fluxograma 2: Obtenção da fração diterpênica ácida 1.	44
Fluxograma 3: Obtenção da fração diterpênica ácida 2.	45
Fluxograma 4: Isolamento de AAC e AC a partir de FDAc2.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condensação de unidades isopentânicas na formação de terpenos.	23
Tabela 2: Atividades biológicas descritas para o oleorresina de <i>C. langsdorffii</i> .	29
Tabela 3: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) e difusão em ágar (mm) de ORC.	31
Tabela 4: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ de AC , AAC e AHC .	38
Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) dos diterpenos naturais AC , AAC e AHC .	47
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos diterpenos naturais AC , AAC e AHC .	48
Tabela 7: Substâncias utilizadas nos ensaios de atividade biológica.	56
Tabela 8: Espécies bacterianas.	59
Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de AC , VM-13 e VM-21 .	98
Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AC , VM-13 e VM-21 .	99
Tabela 11: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de diterpenos naturais e semissintéticos.	113

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

- A549** - Linhagem tumoral de adenocarcinoma alveolar humano
- AAC** - ácido 3-acetóxi-copálico
- AC** – ácido copálico
- AcOEt** – acetato de etila
- AGP01** - Linhagem tumoral de adenocarcinoma gástrico
- AGS** – Linhagem tumoral de estômago
- AHC** - ácido 3-hidroxi-copálico
- ANOVA** - Análise de variância
- AP** – ampicilina
- AR** - Receptor Androgênico
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- B16F10** - Linhagem tumoral de melanoma murinho
- CC₅₀** - Concentração Citotóxica de 50%
- CCC** - Cromatografia em Coluna Clássica
- CCD** - Cromatografia em Camada Delgada
- CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- CL** – clorexidina
- CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COP1** – ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico
- COSY** - *Correlation Spectroscopy*
- COX** – Ciclooxigenase
- DCM** – diclorometano
- dd** – Duplo duplete
- ddd** – Duplo duplete de duplete
- DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- ENC** - Eritrócitos Normocromáticos
- EPC** - Eritrócitos Policromáticos
- ESI-HR-MS** - *High-resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*
- FDAc** – Fração Diterpênica Ácida

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FM – Fórmula Molecular

FNA - Fração Não-Ácida

GM07492-A – Linhagem celular de fibroblastos humanos

GSH - Glutathiona Reduzida

HCT-116 – Linhagem tumoral de carcinoma de cólon humano

HeLa - Linhagem tumoral de câncer cervical

HEp-2 - Linhagem tumoral de carcinoma de laringe humana

HepG2 - Linhagem tumoral de carcinoma hepatocelular hepático humano.

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HsP27 - *Proteína de Choque Térmico (Heat shock protein)*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HT-29 – Linhagem tumoral de carcinoma de cólon humano

Hz – Hertz

I/R – Isquemia/Reperfusão

IC₅₀ - Concentração Inibitória de 50%

IFN- γ – Interferon gama

IL – 1 - Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-6 – Interleucina 6

IV – Espectroscopia no Infravermelho

J - Constantes de Acoplamento

J774 – Linhagem celular de macrófagos de camundongos

LLCMK₂ - Linhagem celular de rim de macaco Rhesus

LNCap - Linhagem tumoral de próstata

LPS – Lipopolissacarídeo

m – Multiplete

MCF-7 – Linhagem tumoral de câncer de mama

MEL-28 – Linhagem tumoral de melanoma humano

MH - Mueller Hinton

MHz – Mega Hertz

MN – Micronúcleo

MO59J - Linhagem tumoral de glioblastoma humano

MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCI-H460 – Linhagem tumoral de pulmão

NF-Kappa B - Fator Nuclear Kappa B

NIHOVCAR – Linhagem tumoral de adenocarcinoma de ovário

NO – óxido nítrico

NTUB1 - Linhagem tumoral de carcinoma de bexiga humana

ORC - oleorresina de copaíba

P-388 – Linhagem tumoral de neoplasia linfóide de ratos DbA/2

PC3 - Linhagem tumoral de próstata

PCC - clorocromato de piridínio

PN – Produto Natural

ppm – partes por milhão

RAW264.7 – Linhagem celular de macrófagos humanos

RMN de ¹H e ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

s – Simpleto

SAR - Relação Estrutura Atividade

SF-268 – Linhagem tumoral de sistema nervoso central

SF-295 – Linhagem tumoral de glioblastoma humano

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SKAMELL-4 - Linhagem tumoral de melanoma

sl – Simpleto largo

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

THP-1 – Linhagem celular contínua de macrófagos humanos

TMS – tetrametilsilano

TNF- α – Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TSA - *Trypticase Soy Agar*

TSB - *Tryptic soy broth*

U251 - Linhagem tumoral de glioblastoma humano

U343 - Linhagem tumoral de glioblastoma humano

UFC – Unidade Formadora de Colônia

V/V ou P/V– volume por volume ou peso por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: TERPENOS	22
1.2. COPAÍBA	24
1.3. OLEORRESINA DE <i>Copaifera</i>	25
1.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OLEORRESINA DE COPAÍBA	26
1.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO OLEORRESINA DE <i>C. langsdorffii</i>	28
1.5.1. Atividade anti-inflamatória.....	29
1.5.2. Atividade antibacteriana	31
1.5.3. Toxicidade	32
1.6. ÁCIDO COPÁLICO E DERIVADOS	33
1.6.1. Atividade anti-inflamatória.....	33
1.6.2. Atividade citotóxica.....	34
1.6.3. Atividade antibacteriana	37
2. OBJETIVOS	41
2.1. GERAL	41
2.2. ESPECÍFICOS	41
3. METODOLOGIA.....	42
3.1. TÉCNICAS GERAIS	42
3.1.1. Instrumentação.....	42
3.1.2. Técnicas cromatográficas	42
3.2. SOLVENTES E REAGENTES.....	43
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.4. ISOLAMENTO DE DITERPENOS DE ORC	43
3.4.1. Partição líquido-líquido	44
3.4.2. Cromatografia em coluna “flash”	45

3.4.3. Cromatografia em coluna clássica – FDAc1	46
3.4.4. Cromatografia em coluna “flash” e em coluna clássica – FDAc2.....	46
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS DITERPENOS ISOLADOS	46
3.6. PROCEDIMENTOS PARA SEMISSÍNTESE DITERPENOS ÁCIDOS DO TIPO LABDANO	49
3.6.1. Preparação de VM-03	49
3.6.2. Preparação de VM-07	50
3.6.3. Preparação de VM-09	51
3.6.4. Preparação de VM-11	52
3.6.5. Preparação de VM-12	52
3.6.6. Preparação de VM-13	53
3.6.7. Preparação de VM-18	54
3.6.8. Preparação de VM-20	55
3.6.9. Preparação de VM-21	55
3.7. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	56
3.7.1. Atividade anti-inflamatória.....	56
3.7.2. Atividade citotóxica.....	58
3.7.3. Atividade antibacteriana	59
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DITERPÊNICA ÁCIDA.....	62
4.2. ISOLAMENTO DE DITERPENOS E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL	64
4.3. SEMISSÍNTESE DE DITERPENOS ÁCIDOS DO TIPO LABDANO	76
4.3.1. Considerações iniciais	76
4.3.2. Epoxidação	77
4.3.3. Esterificação do ácido carboxílico.....	81
4.3.4. Oxidação	85

4.3.5. Desproteção	95
4.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	99
4.4.1. Atividade anti-inflamatória.....	100
4.4.2. Atividade citotóxica.....	107
4.4.3. Atividade antibacteriana	110
5. CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais (PN) vêm sendo historicamente utilizados como forma de melhorar a condição humana, a princípio como misturas e atualmente também como substâncias puras isoladas. Sabe-se que a morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*), foi a primeira substância isolada, farmacologicamente ativa, empregada na elaboração de um produto comercial para uso terapêutico, sendo comercializado desde 1826 (BRAHMACHARI, 2012; HANESSIAN, 2014).

Apesar de serem conhecidas em torno de trezentas mil substâncias naturais obtidas de plantas, esse número se mostra pequeno frente à diversidade de espécies vegetais. Somente 5 a 15% das cerca de 300.000 espécies de plantas superiores foram exploradas. Nota-se que a grande maioria das fontes naturais permanecem inexploradas, mostrando que os produtos naturais podem ser extremamente valiosos na descoberta de novos fármacos (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013; WERMUTH et al., 2015).

A característica marcante dos PNs não se deve apenas à sua diversidade estrutural, mas também por apresentarem atividades biológicas altamente seletivas e específicas. Ou seja, os PNs, além de servirem como fármacos ou modelos na busca de novos fármacos, podem levar a descobertas e melhorias na compreensão de alvos e vias envolvidas no processo da doença (BRAHMACHARI, 2012).

Diante do exposto, pode-se afirmar que os PNs constituem uma fonte abundante de novas substâncias para a química medicinal, sendo, portanto, incorporados a programas de descobertas de novos fármacos.

A química medicinal é conceituada como uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), além do estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (WERMUTH et al., 2015). A descoberta de novos fármacos inclui três etapas importantes: i) descobrimento – que consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas, originadas de produtos naturais, síntese orgânica ou de processos biotecnológicos; ii) otimização – que baseia-se nas modificações sintéticas das estruturas, no sentido de aumentar a potência, seletividade e conferir menor toxicidade; iii) desenvolvimento – que consiste na otimização das rotas sintéticas para a produção em larga escala e a modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância ativa para uso clínico

(WERMUTH et al., 2015). A utilização de PNs ativos como matéria-prima, modelo ou molécula-protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos tem contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos.

Muitos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturas ativas provenientes de fontes naturais (BARREIRO; FRAGA, 2015). Sabe-se que 65% dos medicamentos disponíveis no mercado dentre os anos de 1998 a 2014 estão relacionados com PNs (NEWMAN; CRAGG, 2016). Como exemplo, podem ser citados fármacos como o captopril (Capoten®), obtido a partir da simplificação molecular de um peptídeo isolado do veneno de *Bothrops jararaca* ou ainda o aciclovir (Zovirax®), um derivado purínico sintético, obtido por simplificação molecular do nucleosídeo guanosina (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Estratégias da química medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a agentes terapêuticos. Além disso, essas estratégias são cruciais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, reduzindo efeitos adversos e aumentando sua potência, por exemplo. Dentre muitas, se destaca a variação de grupos funcionais, uma estratégia interessante quando se inicia o estudo de relação estrutura atividade (SAR) de uma substância (BARREIRO, 2002). Nesse caso, obtêm-se derivados através de modificações mínimas na estrutura do precursor, como hidrogenações, metilações, acetilações, modificação de substituintes e isosterismo. Apesar de simples na maioria das vezes, mudanças pequenas poderão produzir alterações expressivas na atividade biológica de um determinado protótipo (WERMUTH et al., 2015).

1.1.METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: TERPENOS

Considera-se como metabolismo um conjunto de reações químicas que constantemente ocorrem em uma célula. Devido à presença de enzimas, tais reações assumem determinadas direções, estabelecendo as rotas metabólicas, sendo seus produtos designados como metabólitos. Essas reações possuem como objetivo principal o aproveitamento de nutrientes para atender as necessidades essenciais das células: energia (derivada de adenosina trifosfato - ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese de substâncias fundamentais a vida (macromoléculas) (SIMÕES et al., 2007).

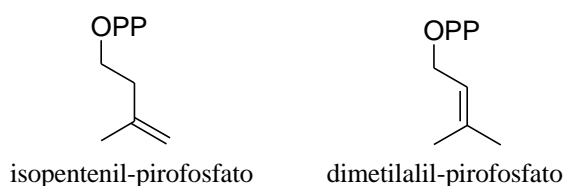
Além do metabolismo primário, essencial à sobrevivência e comum a todos organismos vivos, as plantas possuem a capacidade de produzir inúmeras outras substâncias que não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida, denominadas metabólitos

secundários. Esse conjunto de substâncias, apesar de não ser essencial para o crescimento e desenvolvimento das espécies, pode aumentar a probabilidade de sobrevivência do organismo (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013; SIMÕES et al., 2007).

O termo *terpeno* foi atribuído a substâncias isoladas da terebintina, um líquido volátil extraído de pinheiros. Atualmente estima-se que mais de 55.000 terpenos sejam conhecidos, sendo a classe estruturalmente mais complexa e com o maior número de representantes entre os metabólitos secundários (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013).

Os terpenos são construídos por unidades isopentânicas - isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato (IPP e DMAPP), considerados *isoprenos ativos* (Figura 1). A regra do isopreno afirma que os terpenos são constituídos a partir de duas ou mais unidades isopentânicas unidas na direção “*cabeça-cauda*”, em sua grande maioria, ou “*cabeça-cabeça*” (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013). Essa condensação de unidades isopentânicas geram as diferentes classes dos terpenos, como mostrado na tabela 1.

Figura 1: Unidades isopentânicas.



Fonte: Adaptado de RAMAWAT; MÉRILLON, 2013.

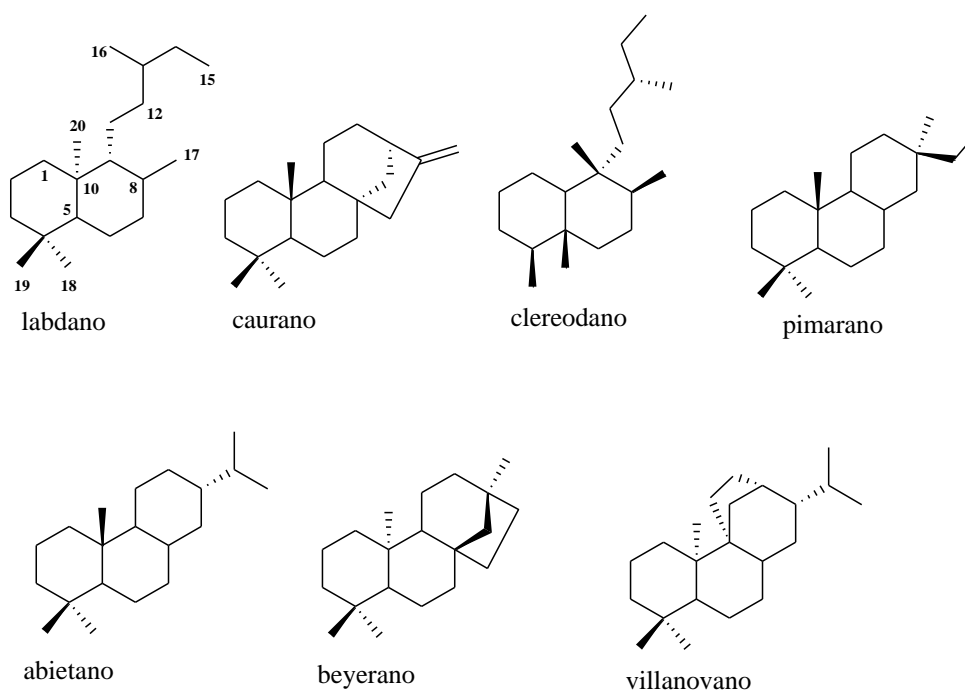
Tabela 1: Condensação de unidades isopentânicas na formação de terpenos.

Nº de unidades isopentânicas	Número de átomos de carbono		Classe
2	10		monoterpenos
3	15		sesquiterpenos
4	20		diterpenos
5	25		sesterpenos
6	30		triterpenos
8	40		tetraterpenos

Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2007.

Os diterpenos são constituídos por quatro unidades isopentânicas geralmente ligadas no formato *cabeça-cauda*, compondo um total de 20 carbonos. Esses metabólitos são divididos em subclasses, que se diferenciam de acordo com seu esqueleto principal (Figura 2). Dentre as subclasses, são conhecidos mais de 500 diterpenos do tipo labdano isolados de plantas superiores, apesar de serem também encontrados em outras fontes, como por exemplo, organismos marinhos. Suas estruturas possuem frequentemente a presença de um hidrocarboneto bicíclico não aromático como estrutura central (ARNÓ et al., 2003; BREITMAIER, 2006).

Figura 2: Subclasses de diterpenos com destaque para o esqueleto labdano.



Fonte: Adaptado de BREITMAIER, 2006

1.2. COPAÍBA

As copaibeiras ou copaíbas (Figura 3) são árvores de crescimento lento que atingem de 5 a 40 metros de altura, pertencentes à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e ao gênero *Copaifera* (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O gênero é nativo das regiões tropicais da América Central e do Sul, da África, podendo também ser encontrado na ilha de Bornéu e na Malásia (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). De acordo com o Index de Kewensis (1996) o gênero *Copaifera* possui 72

espécies, 16 das quais são encontradas exclusivamente no Brasil (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Entre as espécies mais encontradas no Brasil destacam-se a *C. officinalis*, *C. reticulata*, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora*, *C. langsdorffii*, *C. caribacea* e *C. cearensis* (MORS; RIZZINI, 1966; WOOD et al., 1940).

Figura 3: Árvore de *Copaifera langsdorffii*.



Fonte: PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009.

1.3. OLEORRESINA DE *Copaifera*

Do tronco de árvores do gênero *Copaifera* é extraído um bálsamo, com cor e viscosidade variadas, conhecido como óleo de copaíba (TINCUSI et al., 2002). Esse exsudato é corretamente designado como oleorresina devido à presença de ácidos resinosos e substâncias voláteis em sua composição (BRUNETON, 1987; VEIGA JUNIOR et al., 2007). O óleo de copaíba tem grande destaque no cenário econômico e social, principalmente na região do Amazonas onde sua utilização e extração são extremamente difundidas (TINCUSI et al., 2002; VALDEVITE, 2007).

Historicamente, o conhecimento do potencial medicinal do oleorresina de copaíba (ORC) e sua utilização já eram disseminados entre os índios latino-americanos no período em que portugueses chegaram ao Brasil (RAMOS, 2006; SALVADOR, 1975; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Indígenas o empregavam para tratar feridas de guerreiros após batalhas e em recém-nascidos, no coto umbilical (FRANCISCO, 2005; MACIEL et al., 2002). Considera-se

que o primeiro relato de sua atividade farmacológica como cicatrizante e anti-inflamatória tenha ocorrido na época do descobrimento (RAMOS, 2006).

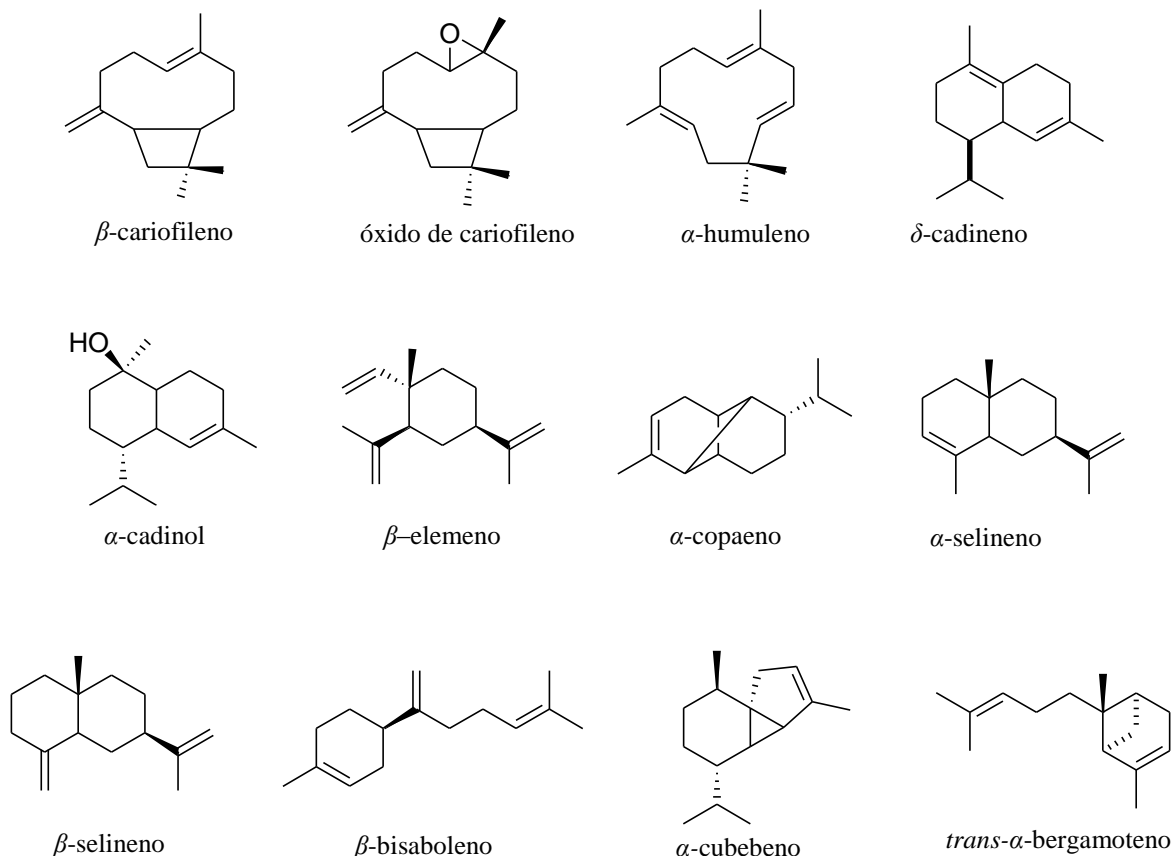
Há relatos também de sua utilização popular por habitantes da região amazônica para tratar diversas doenças e sintomas, tais como: distúrbios respiratórios e do trato urinário, úlceras de estômago, dores de garganta, tonsilite e doenças infecciosas. Esta ampla utilização acarretou na introdução do ORC em produtos fitoterápicos e cosméticos, sendo amplamente empregado na indústria na formulação de loções capilares, fixadores, cremes, sabonetes, entre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

1.4.COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OLEORRESINA DE COPAÍBA

O ORC é constituído por uma porção volátil composta basicamente por sesquiterpenos e uma porção fixa constituída predominantemente por diterpenos. O conteúdo do ORC pode variar considerando fatores externos como ataque de insetos e fungos (RAMOS, 2006). De acordo com Leandro e colaboradores (2012) foram descritos até o momento 110 sesquiterpenos e 42 diterpenos em oleorresinas de copaíba. Os sesquiterpenos são a classe com maior concentração, podendo chegar a compor 90% dos oleorresinas. Dentre os principais sesquiterpenos em ORCs destacam-se: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, α -cadinol, δ -cadineno, α -cubebeno, α -selineno, β -selineno, α -copaeno, β -elemeno, *trans*- α -bergamoteno e β -bisaboleno (Figura 4) (LEANDRO et al., 2012).

Quando avaliados de maneira isolada, muitos dos sesquiterpenos presentes em ORC possuem importantes atividades biológicas. Para o β -cariofileno são descritas as atividades inseticida, antimicrobiana, anestésica local, anticarcinogênica e anti-inflamatória (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; CHENG et al., 2004; GHELARDINI et al., 2001; GOREN et al., 2011; LEGAULT; PICHETTE, 2007; OMOLO et al., 2004; RODILLA et al., 2008; SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007; TUNG et al., 2008). Para o α -cadinol são descritas atividades inseticida contra larvas de mosquito da febre amarela, antitérmica e antifúngica (CHANG et al., 2000; CHENG et al., 2004; HE et al., 1997). O sesquiterpeno β -elemeno apresentou atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais de câncer gástrico, pulmão, laríngeo, ovariano, cérebro, próstata e leucemia (LI et al., 2005; LI et al., 2010; LIU et al., 2011; TAO et al., 2006; WANG et al., 2005; ZHAO et al., 2011; ZOU; LIU; YU, 2001).

Figura 4: Principais sesquiterpenos encontrados nos oleorresinas de *Copaifera sp.*



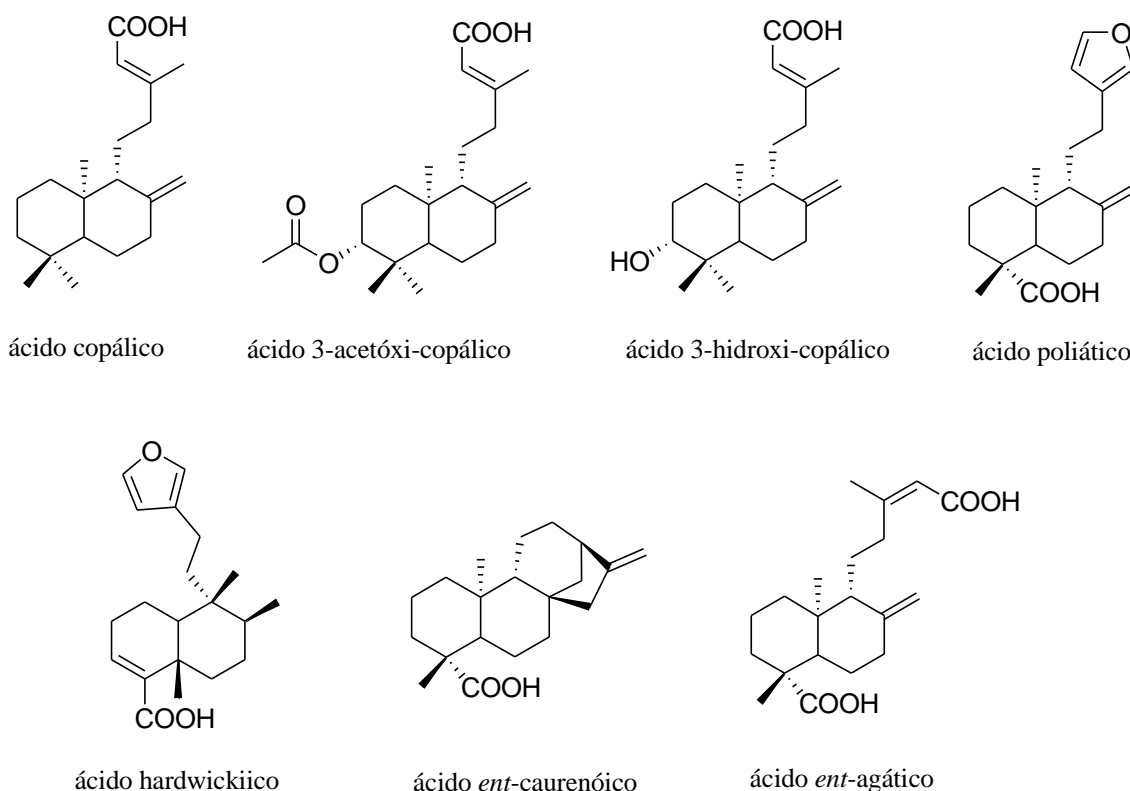
Fonte: LEANDRO et al., 2012.

Os principais diterpenos encontrados nos oleorresinas de copaíba são o ácido copálico, ácido 3-hidroxi-copálico, ácido 3-acetoxi-copálico, ácido poliático, ácido hardwickiico, ácido caurenóico, ácido *ent*-caurenóico e ácido *ent*-agático (Figura 5) (LEANDRO et al., 2012).

Estudos descrevem para o ácido hardwickiico atividades antibacteriana e antifúngica (KUETE et al., 2007; MCCHESENEY; CLARK; SILVEIRA, 1991). O ácido caurenóico apresenta atividade relaxante muscular uterina, anti-inflamatória, antibacteriana, antitripanossoma, vasodilatadora, além de capacidade de indução de genotoxicidade (CAVALCANTI et al., 2006; CUNHA et al., 2003; PAIVA et al., 2003; TINCUSI et al., 2002; TIRAPPELLI et al., 2004; VIEIRA et al., 2002). O ácido poliático apresentou capacidade de promover a inibição do efluxo de rodamina 6G em *Saccharomyces cerevisiae* pela a enzima Pdr5p (proteína que confere resistência múltipla a fármacos) (SOUZA et al., 2010). Esse mesmo diterpeno apresentou atividade atividade antimuscarínica, antibacteriana,

antifúngica e esquistossomicida (ABRÃO et al., 2018; BARBOSA et al., 2019; BORGES et al., 2016; SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2008). Para o ácido *ent*-agático é descrita a atividade antifúngica (BARBOSA et al., 2019).

Figura 5: Principais diterpenos encontrados nos oleorresinas de *Copaifera sp.*



Fonte: LEANDRO et al., 2012.

Entre os diterpenos da fração fixa, o ácido copálico é o único encontrado em todas as espécies de *Copaifera*, podendo ser empregado como um biomarcador do gênero (VEIGA JUNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007). As atividades biológicas já descritas para a substâncias encontram-se detalhadas no item 1.6.

1.5.ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO OLEORRESINA DE *C. langsdorffii*

C. langsdorffii pode ser encontrada em todo território brasileiro, e em decorrência de sua ampla distribuição territorial a espécie possui particular importância (LEITE; LLERAS,

1993), sendo descritas diferentes atividades farmacológicas e biológicas para o oleorresina dela extraído (Tabela 2).

Tabela 2: Atividades biológicas descritas para o oleorresina de *C. langsdorffii*.

Atividade biológica avaliada	Referências
Gastroprotetiva	PAIVA et al., 1998.
Cicatrizante	COMELLI JUNIOR et al., 2010; ESTEVÃO et al., 2013; GUSHIKEN et al., 2017; MASSON-MEYERS et al., 2013; PAIVA et al., 2003; VIEIRA et al., 2008.
Mutagênica e/ou Citotóxica	ABRÃO et al., 2015; CHEN-CHEN; SENA, 2002.
Anti-inflamatória / Antioxidante / Antilipoperoxidativas	GELMINI et al., 2013; NETO et al., 2011; PAIVA et al., 2004a; PAIVA et al., 2004b; SILVA et al., 2009; VIEIRA et al., 2008.
Larvicida - <i>Aedes aegypti</i>	MENDONÇA et al., 2005.
Antibacteriana / Antifúngica	ABRÃO et al., 2015; MASSON et al., 2013; PIERI et al., 2010; PIERI et al., 2011; PIERI et al., 2012; PIERI, et al., 2014; SANTOS et al., 2008a; ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013.
Antileishmaniose	SANTOS et al., 2008b.
Esquistossomicida	BORGES et al., 2016.
Toxicidade materna / Teratogenicidade	LOURENÇO et al., 2009.
Inseticida	MELO et al., 2015.

1.5.1. Atividade anti-inflamatória

O potencial anti-inflamatório do oleorresina de *C. langsdorffii* foi avaliado em modelo de colite induzida por ácido acético empregando ratos *Wistar*. Os animais foram submetidos a tratamentos por via oral e retal nas dosagens de 200 e 400 mg/kg, respectivamente. Os resultados mostraram que o grupo submetido ao tratamento por via retal obteve diminuição relevante do dano colônico e em ambas as vias de administração ocorreu redução do peso

úmido de segmentos colônicos. Em ambas concentrações e vias, ORC inibiu o aumento induzido por ácido acético nos níveis de mieloperoxidase e de malondialdeído, marcadores de infiltração neutrofílica e peroxidação lipídica, respectivamente. Acredita-se que o efeito de ORC sobre a colite induzida por ácido acético possa ser devido às ações antioxidante e anti-lipoperoxidativa dos terpenos de sua composição, conhecidos por prejudicar a sinalização inflamatória através da inibição da atividade do fator nuclear kappaB (NF-kappaB) (PAIVA et al., 2004a).

Paiva e colaboradores (2004b) investigaram a capacidade anti-inflamatória de ORC através da avaliação de sua possível proteção contra danos intestinais associados à isquemia/reperfusão (I/R) em ratos *Wistar*. Os animais foram tratados com ORC, via oral, nas doses de 200 e 400 mg/kg e em seguida os níveis de atividade de mieloperoxidase e catalase, glutatona reduzida, malondialdeído e óxido nítrico (NO) foram determinados. ORC, na dose de 400 mg/kg mostrou redução significativa na atividade de mieloperoxidase, enquanto na menor concentração uma redução de nitrito foi observada. Ambas dosagens mostraram redução de malondialdeído e atividade catalase, além de um aumento nos níveis de glutatona reduzida. A glutatona reduzida é um importante protetor celular e elimina diretamente os radicais livres, enquanto a catalase é uma enzima defensiva amplamente distribuída, que catalisa a quebra de H₂O₂. Os dados indicam que ORC previne o dano tecidual associado a I/R no intestino de ratos e sugere que esse efeito protetor possa ser, pelo menos em parte, devido às suas ações antioxidante e anti-lipoperoxidativa.

Silva e colaboradores (2009) avaliaram também os efeitos de ORC na isquemia/reperfusão de retalhos cutâneos em ratos *Wistar*. Os ratos receberam 200 ou 400 mg/kg de ORC, por gavagem, sendo em seguida dosados os níveis plasmáticos e teciduais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – indicador de peroxidação lipídica), glutatona reduzida (GSH) e níveis teciduais de mieloperoxidase. Observou-se, na maior concentração, uma redução significativa nos níveis das substâncias reativas ao TBARS, aumento significativo de glutatona reduzida na dose de 200 mg/kg e redução significativa na atividade de mieloperoxidase, concluindo que ORC possui ação sobre a lipoperoxidação e intensa atividade antioxidante e anti-inflamatória.

ORC provocou redução significativa no volume do endométrio de ratas *Wistar* com endometriose experimental quando administrado por gavagem. Após duas semanas de tratamento com administração de 0,63 mg/kg diariamente, observou-se redução de 64% no volume médio do endométrio do grupo tratado com relação ao grupo controle (NETO et al., 2011).

Outro estudo observou uma melhora significativa dos sinais clínicos típicos de psoríase em pacientes tratados com ORC. Dois pacientes com história de psoríase crônica de grau leve a moderada receberam o tratamento por via oral (1 mL de ORC/dia). Após três meses de tratamento, foi observada remissão das lesões, sendo consideradas praticamente ausentes. Um terceiro paciente com psoríase grave em ambos cotovelos recebeu tratamento tópico (pomada com ORC 5%, 2 vezes por dia) e após seis semanas de tratamento notou-se melhora nos sinais clínicos, com redução de eritema e descamação (GELMINI et al., 2013).

1.5.2. Atividade antibacteriana

Diversos trabalhos apontam a atividade antibacteriana de ORC sobre diferentes espécies, como: *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexinerii*, *Staphylococcus aureus*, *Aerococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Lactobacillus sp*, *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp* e *Streptococcus pyogenes* (MASSON et al., 2013; PIERI et al., 2010; PIERI et al., 2011; PIERI et al., 2012; PIERI et al., 2014; SANTOS et al., 2008a). Esses trabalhos empregaram diferentes técnicas, utilizando-se do ensaio de concentração inibitória mínima, por microdiluição, ou difusão em ágar, e os valores estão descritos na tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) e difusão em ágar (mm) de ORC.

Bactérias	Concentração inibitória mínima	Referências
	(CIM) / Difusão em ágar	
Oleoresina de <i>C. langsdorffii</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	62,5 $\mu\text{g/mL}$	SANTOS et al., 2008a.
<i>Listeria monocytogenes</i>	9* – 13** mm	PIERI et al., 2010
<i>Escherichia coli</i>	12 – 35 mm	PIERI et al., 2011; PIERI et al., 2012.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,7 mm	PIERI et al., 2012
<i>Shigella flexinerii</i>	18 mm	PIERI et al., 2012
<i>Staphylococcus aureus</i>	200 $\mu\text{g/mL}$ / 14,7* – 16** mm	PIERI et al., 2012; MASSON et al., 2013
<i>Aerococcus sp</i>	11,33 mm	PIERI et al., 2014

<i>Enterococcus sp</i>	11* – 12,7 ** mm	PIERI et al., 2014
<i>Lactobacillus sp</i>	11,7 mm	PIERI et al., 2014
<i>Lactococcus sp</i>	20 mm	PIERI et al., 2014
<i>Leuconostoc sp</i>	11,33* – 30** mm	PIERI et al., 2014
<i>Pasteurella sp</i>	11,67 mm	PIERI et al., 2014
<i>Staphylococcus sp</i>	10,67* – 15** mm	PIERI et al., 2014
<i>Streptococcus sp</i>	7,83* – 12** mm	PIERI et al., 2014
<i>Streptococcus pyogenes</i>	400 µg/mL	MASSON et al., 2013

Notas: * Menor valor encontrado ** Maior valor encontrado.

1.5.3. Toxicidade

Um estudo preliminar sobre a toxicidade de ORC foi realizado com o objetivo de avaliar sua possível atividade mutagênica e tóxica sobre camundongos *Mus musculus*. A mutagenicidade da administração oral de ORC foi avaliada pelo teste de micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) de medula óssea, sendo observado um aumento na frequência de MN, dose dependente, em todas as dosagens utilizadas (2,11, 4,22 e 4,76 mL/kg), em 24 h. A frequência de MN constatada possivelmente pode ser atribuída à toxicidade do oleoresina, verificada pela relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (ENC), que variou de 0,61 a 0,26, enquanto para o controle o valor de EPC/ENC foi de 0,92. Essa relação pode indicar a possível citotoxicidade de uma amostra, ou seja, quanto menor o valor obtido, maior citotoxicidade. Ao se observar a faixa de valor obtido nota-se valores baixos, podendo-se afirmar a presença de atividade mutagênica e tóxica, dose dependente (CHEN-CHEN; SENA, 2002).

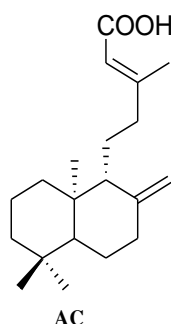
Lourenço e colaboradores (2009) avaliaram a toxicidade materna e a teratogenicidade de ORC sobre camundongos *Mus musculus*. O oleoresina foi administrado por gavagem durante 5 dias do período gestacional de fêmeas, nas doses de 0,3; 0,6 e 0,9 mL/kg. Não foi observada diferença estatisticamente relevante entre os grupos tratado e controle quanto ao ganho de peso materno, peso dos órgãos, número de fetos vivos e viabilidade fetal, sugerindo que ORC não apresentou toxicidade materna. Os valores de peso e comprimento fetal dos grupos tratados mostraram diferenças estatísticas quando comparados ao controle, entretanto os fetos ainda se encontravam dentro do peso adequado à idade gestacional. A prole das fêmeas tratadas não apresentou malformações ou alterações externas, viscerais e esqueléticas.

Esses resultados indicam que ORC, nas doses administradas e período estudado, não apresentou toxicidade materna ou causou teratogenicidade na prole das fêmeas tratadas.

1.6. ÁCIDO COPÁLICO E DERIVADOS

O ácido copálico (**AC**) (Figura 6) pertence ao grupo dos diterpenos labdanos e foi descrito pela primeira vez por Nakano e Djerassi (1961). Apesar de possuir grande potencial biológico - descrito a seguir, e abundância natural, até o momento poucos trabalhos têm utilizado o composto como precursor para a síntese de derivados bioativos.

Figura 6: Estrutura molecular do ácido copálico.



Fonte: NAKANO; DJERASSI, 1961.

1.6.1. Atividade anti-inflamatória

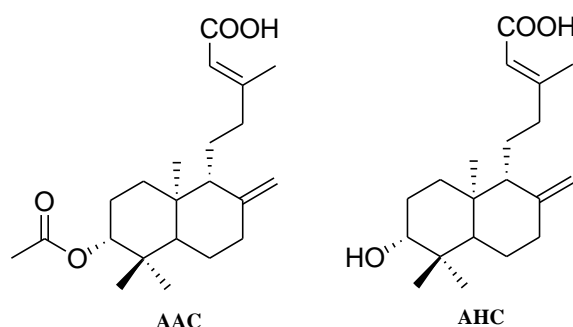
A atividade anti-inflamatória de **AC** foi avaliada através de sua capacidade em inibir as enzimas ciclooxigenases (COX) e a peroxidação lipídica. A substância inibiu COX-1 em 21% e COX-2 em 39%, apresentando maior seletividade para COX-2, além de uma inibição em 44% da peroxidação lipídica (LIU; NAIR, 2011).

A influência do **AC** na produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada sobre macrófagos murinos (J774) estimulado com lipopolissacarídeo (LPS). Na concentração de 164 μM , ocorreu inibição de 98,5% da produção NO, com $\text{IC}_{50} = 57,4 \mu\text{M}$. Observou-se ainda, na concentração de 25 μM , uma inibição na produção de IL-6 (4,2% - pró-inflamatória) e um aumento da produção de IL-10 (anti-inflamatória) (VARGAS et al., 2015).

Dois diterpenos naturais, estruturalmente relacionados com **AC**, ácido 3-acetóxi-copálico (**AAC**) e ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**) (Figura 7) provocaram indução na

produção de IL-10 a 25 μM , enquanto **AAC** mostrou ainda uma inibição de IL-6 em 23,8% na concentração de 25 μM (VARGAS et al., 2015).

Figura 7: Estrutura molecular do ácido 3-acetóxi-copálico (**AAC**) e ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**).



Fonte: VARGAS et al., 2015

1.6.2. Atividade citotóxica

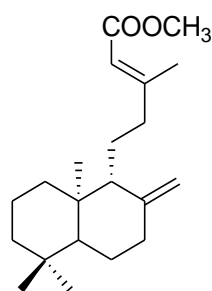
Diversos estudos investigaram o potencial citotóxico de **AC** contra linhagens de células tumorais, entretanto, de maneira geral, a substância apresentou reduzida atividade. **AC** foi descrito como inativo frente às seguintes linhagens de células tumorais: P-388 (neoplasia linfóide de ratos DBA/2), A549 (adenocarcinoma alveolar humano), HT-29 (carcinoma de cólon humano), MEL-28 (melanoma humano), AGP-01 (adenocarcinoma gástrico), HCT-116 (carcinoma de cólon humano), NIHOVCAR (adenocarcinoma de ovário), SKAMELL-4 (melanoma), SF-295 (glioblastoma humano), B16F10 (melanoma murino), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano), HepG2 (carcinoma hepático humano), MO59J (glioblastoma humano), U343 (glioblastoma humano) e U251 (glioblastoma humano) (ABRAO et al., 2015; TINCUSI et al., 200; VARGAS et al., 2015).

Apesar da reduzida atividade descrita em muitos trabalhos, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ o **AC** inibiu a proliferação de células tumorais de pulmão (NCI-H460) em 10%, de cólon (HCT-116) em 26%, de estômago (AGS) em 35%, do sistema nervoso central (SF-268) em 27% e de mama (MCF-7) em 34% (LIU; NAIR, 2011). A substância apresentou também efeito antiproliferativo significativo contra a linhagem de célula tumoral HeLa com IC_{50} = 44,03 $\mu\text{g/mL}$, valor inferior ao observado para o quimioterápico etoposídeo (ABRÃO et al., 2015).

Os diterpenos **AAC** e **AHC** apresentaram reduzida atividade antiproliferativa, na concentração de 20 μM , frente às linhagens tumorais de adenocarcinoma gástrico (AGP01) (8,5 – 13,1% de inibição) e glioblastoma humano (SF-295) (20% de inibição). Nessa mesma concentração, **AHC** apresentou ainda uma pequena inibição no crescimento da linhagem tumoral de carcinoma de cólon humano (HCT-116) (4,7%), enquanto o **AAC** mostrou uma inibição de 2,0% frente ao adenocarcinoma de ovário (NIHOVCAR) (VARGAS et al., 2015).

Em relação aos derivados semissintéticos obtidos a partir de **AC**, **AAC** e **AHC** estudos de atividade citotóxica são considerados escassos. O copalato de metila, derivado semissintético de **AC** (**1**) (Figura 8) apresentou atividade antiproliferativa moderada com valores de IC_{50} de 2,5; 5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ contra as linhagens de neoplasia linfóide de camundongo DBA/2 (P-388), adenocarcinoma alveolar humano (A549), carcinoma de cólon humano (HT-29) e melanoma humano (MEL-28), respectivamente (TINCUSI et al., 2002).

Figura 8: Estrutura molecular do copalato de metila.



Fonte: TINCUSI et al., 2002.

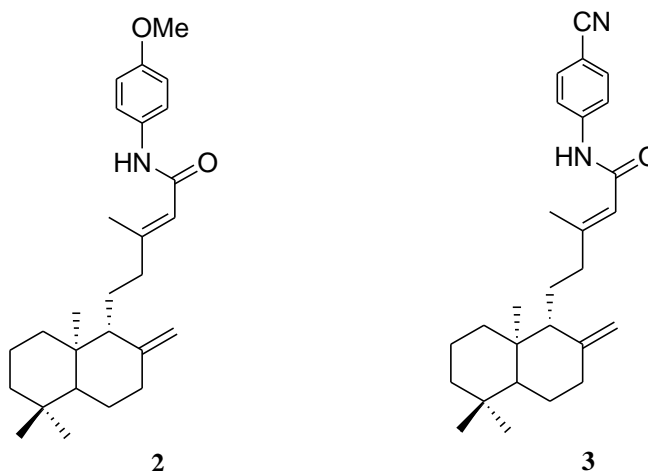
AC e o **AAC** apresentaram inibição da pequena chaperona, *proteína de choque térmico* (*Heat shock protein* - Hsp27), associada com o desenvolvimento de resistência tumoral. Apesar da atividade anti-chaperona, se observou uma fraca inibição do crescimento de linhagens de células tumorais de próstata (LNCap e PC3), que expressam tal proteína (LAMA et al., 2014). As HsPs são consideradas chaperonas moleculares que auxiliam no dobramento e na função de outras proteínas. Essas proteínas, em células normais, estão envolvidas na homeostasia proteica, porém em caso de doença, as HsPs são sequestradas, passando a auxiliar no desenvolvimento da doença (MCCONNELL; MCALPINE, 2013).

Em células tumorais, a HSP27 está especialmente relacionada à proteção contra a morte celular programada. Tal proteína interage diretamente com outras proteínas funcionais, afetando múltiplos estágios da apoptose, como a liberação de citocromo c e ativação de caspases (IDIPPILY et al., 2017; VIDYASAGAR; WILSON; DJAMALI, 2012).

As HsPs são agentes fundamentais envolvidos no desenvolvimento do câncer, sendo consideradas alvos terapêuticos promissores. Assim, um estudo realizado por Lama et al. (2014) avaliou a atividade anti-chaperona de **AC** e sua estrutura relacionada (**AAC**), observando que na concentração de 3,5 µg/mL, **AC** e **AAC** provocaram inibição de Hsp27 em 38 e 20%, respectivamente. A partir desses resultados foi proposta uma possível atividade antiproliferativa contra duas linhagens de células de câncer de próstata que expressam Hsp27, LNCap e PC3. Os resultados mostraram que para o **AC** a 500 µM a viabilidade celular foi em torno de 75% frente a linhagem celular LNCap e de cerca de 50% frente a linhagem celular PC3, enquanto na mesma concentração o **AAC** mostrou viabilidade celular de 50% para ambas linhagens (LAMA et al., 2014).

O receptor androgênico (AR) é conhecido por ser uma “proteína cliente” de Hsp27, estando ligado ao desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Tentando entender melhor os resultados observados por Lama e colaboradores (2014), um trabalho subsequente determinou a expressão de receptor androgênico (AR) em células de câncer de próstata (LNCaP) tratadas com **AC**. Os resultados mostraram que na concentração de 200 µM a substância diminuiu a quantidade de AR nas células testadas, devido à inibição da chaperona Hsp27 (IDIPPILY et al., 2017). A supressão de AR via inibição de chaperonas apresenta potencial para tornar-se um novo alvo para prevenção ou tratamento do câncer de próstata. No mesmo trabalho, 15 análogos semissintéticos do **AC** também foram avaliados quanto à influência na expressão de AR em células LNCaP. Dentre as substâncias testadas, as amidas **2** e **3** (Figura 9) reduziram drasticamente AR nas células LNCaP na concentração de 20 µM, com IC₅₀ de 1,73 µM e 9,81 µM, respectivamente. Baseado na estrutura sugere-se que mudanças na hidrofobicidade possam contribuir para o aumento da atividade. Os resultados apontam que os análogos **2** e **3** apresentam regulação negativa de AR e inibição do crescimento de células LNCaP, podendo ser empregados como compostos-protótipos para o desenvolvimento de um novo fármaco contra câncer de próstata (IDIPPILY et al., 2017).

Figura 9: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos do ácido copálico **2** e **3**.



Fonte: IDIPPILY et al., 2017.

1.6.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana de **AC** foi avaliada contra diferentes espécies bacterianas, sendo ativo frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* (), *Bacteroides fragilis*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Kocuria rhizophila*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus hirae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus capitis*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* (ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013; SOUZA et al., 2011a; SOUZA et al., 2011b; TINCUSI et al., 2002).

O diterpeno **AAC** apresentou atividade contra as seguintes espécies: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *B. fragilis*, *A. naeslundii*, *P. gingivalis*, *P. anaerobius*, *K. rhizophila*, *S. pyogenes*, *S. pneumonie*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *S. epidermidis* (ABRÃO et al., 2015; SOUZA et al., 2011a; SOUZA et al., 2011b). **AHC** mostrou atividade contra *A. naeslundii*, *P. gingivalis*, *P. anaerobius*, *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum* (SOUZA et al., 2011b). Na tabela 4 tem-se os valores de concentração inibitória mínima obtidos nesses estudos.

Tabela 4: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL de AC, AAC e AHC.

Bactérias	Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL)			Referências
	Substâncias			
	AC	AAC	AHC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25* – 25,0**	180,0	-	ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013; TINCUSI et al., 2002.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,5* – 50,0**	30,0	-	ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013; TINCUSI et al., 2002.
<i>Bacillus subtilis</i>	5,0* – 6,3**	90,0	-	ABRÃO et al., 2015; TINCUSI et al., 2002.
<i>Streptococcus salivarius</i>	2,0	12,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Streptococcus sobrinus</i>	3,0	40,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Streptococcus mutans</i>	3,0	40,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Streptococcus mitis</i>	5,0	60,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Streptococcus sanguinis</i>	6,0	60,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Lactobacillus casei</i>	4,0	50,0	-	SOUZA et al., 2011a.
<i>Bacteroides fragilis</i>	25,0	100,0	-	SOUZA et al., 2011b.
<i>Actinomyces naeslundii</i>	6,2	25,0	100,0	SOUZA et al., 2011b.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3,1	25,0	25,0	SOUZA et al., 2011b.
<i>Prevotella nigrescens</i>	200,0	200,0	200,0	SOUZA et al., 2011b.
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	200,0	200,0	200,0	SOUZA et al., 2011b.
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3,1	12,5	25,0	SOUZA et al., 2011b.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1,0* – 1,56**	80,0	-	ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,56* – 2,0**	90,0	-	ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013.
<i>Kocuria rhizophila</i>	5,0	80,0	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3,0	60,0	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,0* – 31,25**	50,0	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Enterococcus hirae</i>	15,0	-	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Bacillus cereus</i>	8,0	100,0	-	ABRÃO et al., 2015.

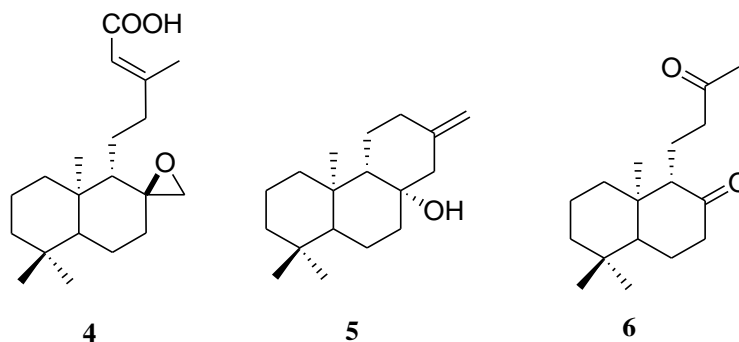
<i>Staphylococcus capitis</i>	31,25* – 50,0**	-	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Enterococcus faecium</i>	50,0	-	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,6* – 25,0**	-	-	ABRÃO et al., 2015.
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	15,6* – 100*	-	-	ABRÃO et al., 2015.

Notas: * Menor valor de MIC encontrado ** Maior valor de MIC encontrado.

Alguns estudos avaliaram a atividade antimicrobiana dos ésteres metílicos de **AC**, **AAC** e **AHC** e todos encontraram uma redução ou perda da atividade antimicrobiana (ABRÃO et al., 2015; SOUZA et al., 2011a; TINCUSI et al., 2002). Esses resultados permitem inferir que a presença do ácido carboxílico na cadeia lateral influencie diretamente na atividade, pois ao transformá-lo em éster metílico a atividade foi expressivamente reduzida (ABRÃO et al., 2015, SOUZA et al., 2011a, TINCUSI et al., 2002). Nota-se que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis às substâncias testadas que as bactérias Gram-negativas, provavelmente devido à diferente estrutura celular. Nas bactérias Gram-positivas, além da membrana plasmática, existe uma parede espessa constituída predominantemente por peptidoglicanos. Já bactérias Gram-negativas possuem membrana externa, parede celular fina e membrana plasmática. Acredita-se que os antimicrobianos tenham mais dificuldade de penetrar em bactérias Gram-negativas devido à membrana externa, composta por lipopolissacarídeos, que controlam as propriedades de superfície como permeabilidade e suscetibilidade aos antibióticos, agindo como uma barreira natural (ABRÃO et al., 2015).

Avaliado frente à *Micobacterium tuberculosis*, **AC** apresentou CIM 125 µg/mL, considerado um valor alto e pouco promissor (MATOS et al., 2015; SILVA et al., 2017). Visando a melhoria da atividade, três derivados de **AC** foram obtidos através da epoxidação (**4**), reação aldólica (**5**) e ozonólise (**6**) (Figura 10). As substâncias **4** e **6** apresentaram valores de CIM de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente, sendo considerados valores promissores. O análogo **5** foi o que apresentou melhor resultado, com CIM de 6,25 µg/mL, valor equivalente a fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose, como estreptomicina e pirazinamida (MATOS et al., 2015).

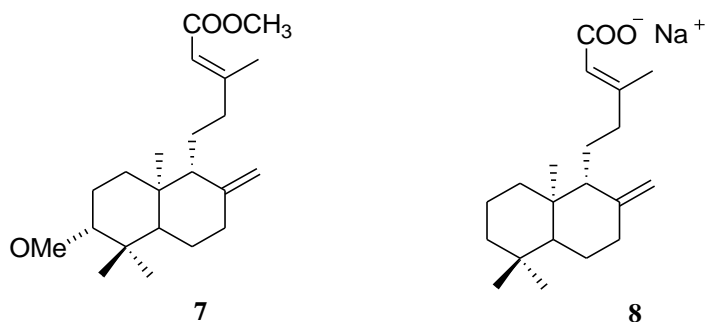
Figura 10: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos do ácido copálico **4**, **5** e **6**.



Fonte: MATOS et al., 2015.

Dois outros derivados semissintéticos de **AHC** (**7**) e **AC** (**8**) (Figura 11) também apresentaram incremento na atividade antitubercular, com valores de CIM de 25 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SILVA et al., 2017).

Figura 11: Estrutura molecular dos derivados semissintéticos **7** e **8**.



Fonte: SILVA et al., 2017.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consiste no isolamento de diterpenos ácidos do tipo labdano do oleorresina de *Copaifera langsdorffii*, e sua utilização como material de partida na obtenção de derivados semissintéticos e avaliação das potenciais atividades citotóxica, anti-inflamatória e antibacteriana.

2.2.ESPECÍFICOS

- Isolar, a partir do oleorresina de *C. langsdorffii*, diterpenos ácidos do tipo labdano em quantidades adequadas para utilização como material de partida na síntese de derivados semissintéticos;
- Realizar modificações estruturais utilizando estratégias clássicas da química medicinal, como variação e adição de substituintes;
- Explorar a reatividade das diferentes funcionalidades presentes nas estruturas através de reações de epoxidação, esterificação, oxidação, entre outras;
- Avaliar diterpenos naturais e derivados semissintéticos quanto à atividade citotóxica, anti-inflamatória e antibacteriana através da interação com grupos de pesquisa desta Universidade;
- Realizar análise de SAR com os dados de atividade biológica obtidos.

3. METODOLOGIA

3.1. TÉCNICAS GERAIS

3.1.1. Instrumentação

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos por transmissão direta empregando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum Two TM, com transformada de Fourier. A análise dos espectros foi realizada empregando o software Origin Pro[®] 9.0.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram realizados em equipamentos Bruker Fourier (300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C), tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl₃). Os valores de deslocamento químico (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. A análise dos espectros foi realizada através do software MestRenova[®] versão 7.0.0-8331 e TopSpin[®] 2.1.

Os espectros de massas de alta resolução (ESI-HR-MS) foram obtidos em espectrômetro do tipo Bruker-Daltonics MicroTOF – Q II, em modo positivo. Os solventes empregados foram metanol e acetonitrila e a todas as amostras foi adicionado acetato de amônio.

3.1.2. Técnicas cromatográficas

Todo o processo de isolamento de diterpenos naturais e de purificação dos produtos das reações foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF₂₅₄ (MACHEREY-NAGEL[®]), visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e/ou revelação através de pulverização com anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento.

Para obtenção dos precursores foram realizadas inicialmente colunas *flash* em funil de vidro sinterizado, utilizando sílica gel 60 (Merck[®]) como suporte e mistura de solventes hexano:AcOEt em ordem crescente de polaridade.

A purificação final dos precursores e dos produtos de reação foi realizada através de cromatografia em coluna clássica (CCC), utilizando sílica gel 70-230 mesh (Merck[®]) como

suporte e diferentes solventes orgânicos, puros ou em mistura, como fase móvel.

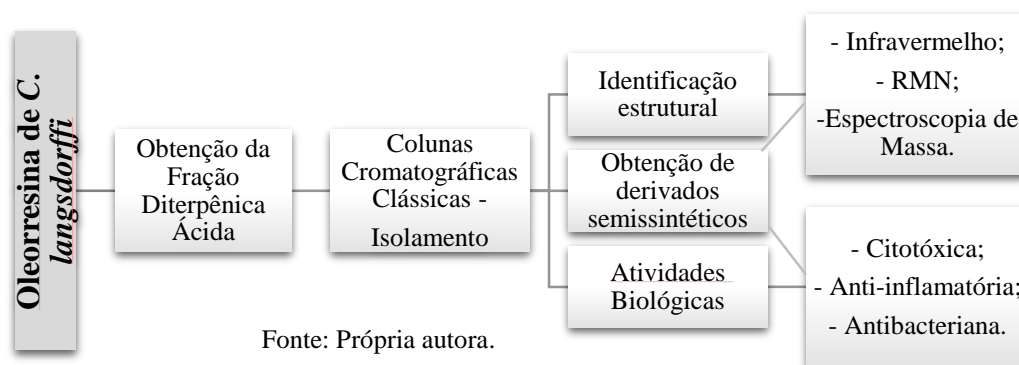
3.2.SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Neon, Vetec ou Tedia. Todos os demais reagentes foram comprados da empresa Sigma-Aldrich®. Quando necessário, solventes e reagentes foram purificados seguindo métodos descritos por Perrin e Armarego (1988).

3.3.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esse trabalho partiu do oleoresina de *C. langsdorffii* para o isolamento de diterpenos labdanos ácidos em quantidades suficientes para a síntese de derivados. Após identificação estrutural, essas substâncias foram submetidas a modificações estruturais e os produtos obtidos também foram identificados. Por fim, os diterpenos naturais e derivados semissintéticos foram submetidos à avaliação de suas potenciais atividades biológicas (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Experimentos realizados no presente trabalho.



3.4.ISOLAMENTO DE DITERPENOS DE ORC

O oleoresina de *Copaifera langsdorffii* (lote 007900117) foi adquirido comercialmente da empresa Apis Flora® Indústria e Comércio (Ribeirão Preto, SP). O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no SisGen sob o número A7DABE3.

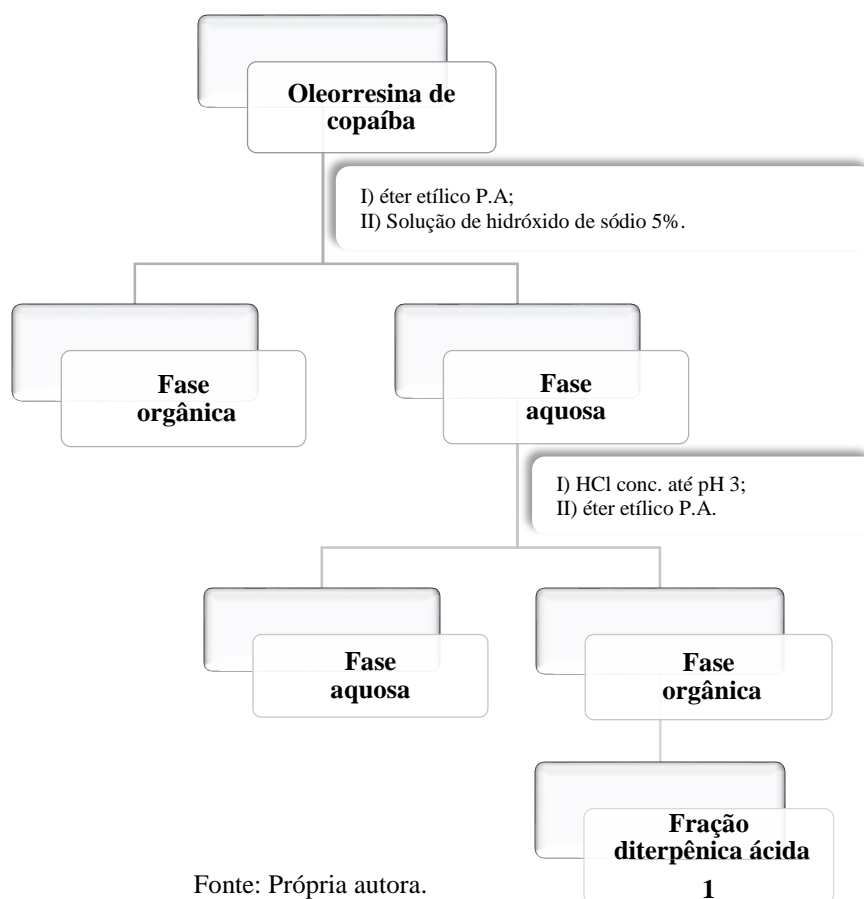
O ORC é constituído basicamente por duas classes distintas de terpenos: sesquiterpenos (fração volátil) e diterpenos (fração fixa). Duas metodologias foram empregadas para obtenção da fração diterpênica ácida (FDAC), rica em diterpenos ácidos. No

primeiro procedimento utilizou-se a técnica de partição líquido-líquido, enquanto no segundo método empregou-se a cromatografia em coluna *flash* utilizando sílica impregnada com hidróxido de potássio (KOH).

3.4.1. Partição líquido-líquido

A metodologia de partição líquido-líquido foi adaptada de Romero (2007). Cerca de 100 g da amostra foi transferida para um funil de separação juntamente com 250 mL de éter etílico e 125 mL de solução aquosa de KOH (5%, v/v). O funil de separação foi submetido a agitação e a fase aquosa separada. Este procedimento foi realizado por três vezes e em seguida toda fase aquosa foi acidificada a pH 3, com ácido clorídrico (HCl) concentrado. A partição com éter etílico foi realizada novamente, utilizando 150 mL do solvente, por três vezes. A fase orgânica foi lavada com água destilada até alcançar pH 7, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada em evaporador rotatório para obtenção da fração diterpênica ácida 1 (FDAc1) (Fluxograma 2).

Fluxograma 2: Obtenção da fração diterpênica ácida 1.



Fonte: Própria autora.

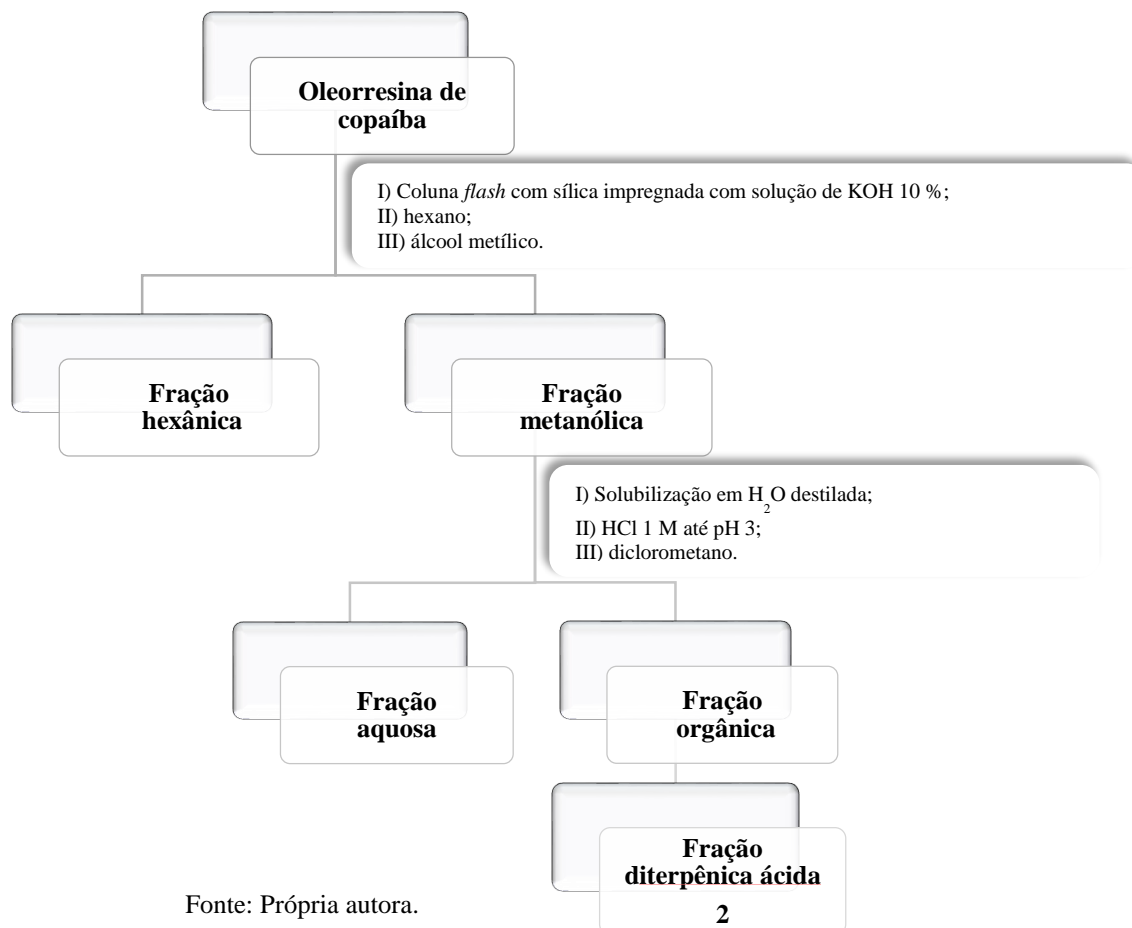
3.4.2. Cromatografia em coluna “flash”

A segunda metodologia utilizada para a obtenção da fração rica em diterpenos ácidos foi adaptada de Silva (2016), utilizando sílica impregnada com KOH.

À sílica-gel G60 para CCD foi adicionada uma solução aquosa de KOH (10%, v/v) (100 g de sílica-gel/100 mL da solução de KOH), que depois de homogeneizada permaneceu em estufa por 24 h à temperatura de 90 °C. Utilizando um funil com placa de vidro sinterizado empacotado com a sílica gel impregnada, cerca de 40 g de ORC foi submetida à cromatografia em coluna *flash*. A amostra foi aplicada sobre a fase estacionária compactada e eluída com hexano (1500 mL), seguido de metanol (1000 mL).

A fração metanólica foi concentrada em evaporador rotatório e diluída em água destilada. Utilizando HCl 1 M, a fração foi acidificada até pH 3 e particionada com diclorometano (DCM). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada, obtendo assim a fração diterpênica ácida 2 (FDAc2) (Fluxograma 3).

Fluxograma 3: Obtenção da fração diterpênica ácida 2.



3.4.3. Cromatografia em coluna clássica – FDAc1

FDAc1 foi submetida à CCC utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e a combinação de hexano:AcOEt (90:10 v/v) como fase móvel. A partir dessa coluna foi possível isolar ácido 3-acetoxi-copálico (**AAC**), ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**) e um novo diterpeno para o gênero *Copaifera*, **COP1**.

A coluna com FDAc1 deu origem a 20 frações (F1-F20), agrupadas de acordo com sua semelhança cromatográfica. A fração F06 foi submetida à CCC utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (90:10 v/v) como fase móvel para o isolamento de ácido copálico (**AC**).

3.4.4. Cromatografia em coluna “flash” e em coluna clássica – FDAc2

FDAc2 foi submetida à coluna cromatográfica do tipo *flash* em funil com placa de vidro sinterizado, utilizando como fase estacionária sílica gel para CCD G60. A fase móvel consistiu em frações de 300 mL da mistura de solventes hexano:AcOEt, com proporção crescente de AcOEt, até 100%. Nessa etapa foram obtidas 5 frações (CLA1 – CLA5), agrupadas de acordo com sua semelhança cromatográfica.

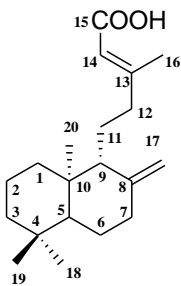
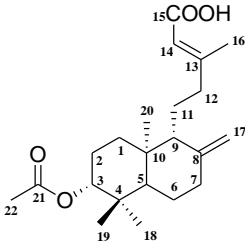
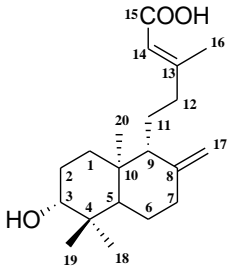
A fração CLA2 foi submetida à CCC utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (90:10, v/v) como fase móvel. A partir dessa coluna foi possível isolar **AC**.

De maneira similar, a fração CLA3 foi submetida à CCC utilizando de sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (90:10, v/v) como fase móvel. Dessa coluna foram obtidas 289 frações. As frações 67-74 e 125-174 foram agrupadas e submetidas a nova separação cromatográfica para isolamento de **AAC**.

3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS DITERPENOS ISOLADOS

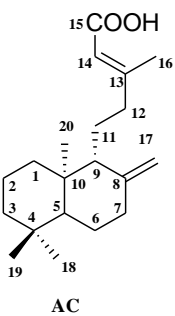
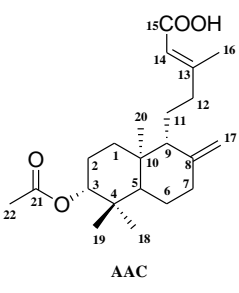
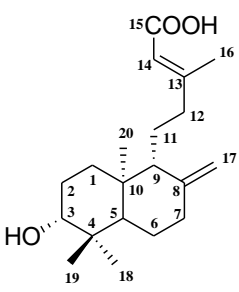
Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos diterpenos **AC**, **AAC** e **AHC**, já descritos para ORC, são apresentados nas Tabelas 5 e 6 (CAVIN et al., 2006; VARGAS et al., 2015). Os dados completos de **COP1**, inédito para a planta, são descritos na sequência (POPOVA et al., 2009).

Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) dos diterpenos naturais **AC**, **AAC** e **AHC**.

	^{13}C	AC δ_c	AAC δ_c	AHC δ_c
	1	39,2	36,8	37,1
 <p>AC</p>	2	19,5	23,9	27,9
	3	42,2	80,7	78,9
	4	33,7	38,1	39,2
	5	55,6	54,7	54,6
	6	24,5	24,3	24,0
	7	38,4	38,0	38,2
	8	148,4	147,5	147,7
 <p>AAC</p>	9	56,3	55,8	55,8
	10	39,8	39,3	39,5
	11	21,8	21,7	21,7
	12	40,2	40,0	40,0
	13	164,3	163,8	163,9
	14	114,7	114,8	114,9
	15	171,4	171,4	171,7
 <p>AHC</p>	16	19,3	19,3	19,3
	17	106,5	107,1	106,9
	18	21,6	16,6	15,5
	19	33,7	28,3	28,4
	20	14,6	14,6	14,6
	21		171,1	
	22		21,3	

Fonte: Própria autora.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos diterpenos naturais **AC**, **AAC** e **AHC**.

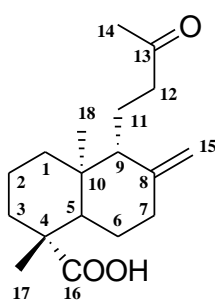
	^1H	AC δH (<i>J</i> em Hz)	AAC δH (<i>J</i> em Hz)	AHC δH (<i>J</i> em Hz)	
 <p>AC</p>	1	1,78 m	1,78 m	1,78 m	
	1	1,04 m	1,24 m	1,12 m	
	2b	1,56 m	1,75 m	1,71m	
	2a	1,50 m	1,62 m	1,59 m	
	3	1,41 m	4,51 m	3,28 dd (11,5 e 4,2)	
	3	1,17 m	-	-	
	4	-	-	-	
	5	1,11 m	1,18 m	1,07 m	
	6b	1,55 m	1,75 m	1,75 m	
	 <p>AAC</p>	6a	1,32 m	1,38 ddd (25,7; 12,9; 4,2)	1,39 ddd (25,7; 12,9; 4,2)
7b		2,38 m	2,41 m	2,41 m	
7a		2,04 m	1,97 m	1,95 m	
8		-	-	-	
9		1,60 m	1,56 m	1,54 m	
10		-	-	-	
 <p>AHC</p>		11b	1,67 m	1,65 m	1,64 m
		11a	1,47 m	1,56 m	1,51 m
		12b	2,38 m	2,33 m	2,33 m
		12a	2,03 m	1,99 m	1,98 m
	13	-	-	-	
	14	5,67s	5,67 s	5,67 s	
	15	-	-	-	
	16	2,17 s	2,17 s	2,17 s	
	17b	4,85 sl	4,88 sl	4,87 sl	
	17a	4,49 sl	4,52 m	4,51 sl	
18	0,80 s	0,85 s	0,78 s		
19	0,87 s	0,88 s	1,00 s		

20	0,68 s	0,72 s	0,69 s
21		-	-
22		2,06 s	-

Fonte: Própria autora.

Notas: (s) – simpleto; (sl) – simpleto largo; (ddd) duplo duplete de duplete; (dd) duplete; (m) mutiplete.

ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico (COP1)



IV (KBr, cm^{-1}): 3300-2500 (O-H), 2934 (C-H), 1717 (C=O), 1694 (C=O) e 1642 (C=C).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 4,85 (1H, sl, H-15b), 4,45 (1H, sl, H-15a), 2,60 (1H, ddd, J = 17,5 e 4,3 Hz, H-12), 2,39 (1H, m, H-7), 2,32 (1H, m, H-12), 2,15 (1H, m, H-3), 2,11 (3H, s, H-14), 1,98 (1H, m, H-6), 1,89 (1H, m, H-1), 1,88 (1H, m, H-7), 1,87 (1H, m, H-11), 1,87 (1H, m, H-6), 1,85 (1H, m, H-2), 1,56 (1H, m, H-11), 1,55 (1H, m, H-9), 1,52 (1H, m, H-2), 1,32 (1H, m, H-5), 1,23 (3H, s, H-17), 1,12 (1H, td, J = 13,4 e 4,1 Hz, H-1), 1,05 td (1H, td, J = 13,4 e 3,8Hz, H-3), 0,61 (3H, s, H-18).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 209,5 (C-13), 182,9 (C-16), 147,8 (C-8), 106,7 (C-15), 56,3 (C-5), 55,6 (C-9) 44,2 (C-4), 42,9 (C-12), 40,7 (C-10), 39,1 (C-1), 38,7 (C-7), 38,1 (C-3), 30,2 (C-14), 29,1 (C-17), 26,2 (C-6), 17,8 (C-11), 20,0 (C-2), 12,8 (C-18).

FM: $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$ **MM:** 292,41

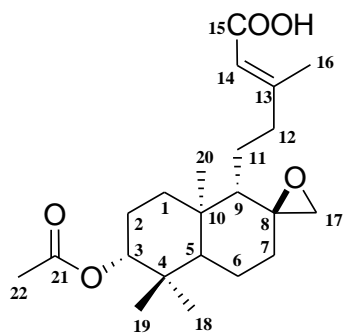
3.6.PROCEDIMENTOS PARA SEMISSINTESE DITERPENOS ÁCIDOS DO TIPO LABDANO

As modificações estruturais foram realizadas no Laboratório de Sínteses Orgânica de Moléculas Bioativas da Facultad de Ciencias Exactas y Naturales da Universidad de Buenos Aires – Argentina, sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Javier Durán.

3.6.1. Preparação de VM-03

Uma solução de AAC (20 mg; 0,055 mmol) dissolvida em 1,6 mL de DCM foi resfriada até 0 °C e então adicionado ácido meta-cloroperoxibenzóico 70% (mCPBA – 20 mg; 0,0825 mmol), sob agitação. A solução foi mantida sob agitação por 24 h a 0 °C, sendo

finalizada com solução saturada de bicarbonato de sódio ($\text{NaHCO}_3 - 20 \text{ mL}$). A fase orgânica foi lavada com a mesma solução por 3 vezes, seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 8:2) para obtenção de **VM-03**.



IV (KBr, cm^{-1}): 3710 a 2438 (O-H), 2937 (C-H), 1728 (C=O), 1700 (C=O), 1640 (C=C), 1299 (C-O) e 1251 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,67$ (1H, s, H-14), 4,51 (1H, dd, $J = 11,6$ e $4,2$ Hz, H-3), 2,76 (1H, dd, $J = 4,3$ e $1,4$ Hz, H-17b), 2,53 (1H, d, $J = 4,3$ Hz, H-17a), 2,29 (1H, m, H-12), 2,13 (3H, d, $J = 1,1$ Hz, H-16), 2,06 (3H, s, H-22), 1,95 – 1,86 (2H, m), 1,87 – 1,68 (3H, m), 1,67 – 1,50 (3H, m), 1,45 – 1,36

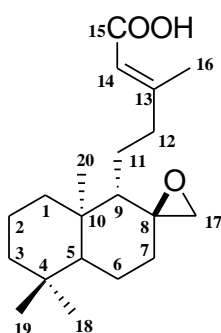
(2H, m), 1,32 – 1,24 (2H, m), 1,17 – 1,10 (2H, dd, $J = 12,2$ e $2,3$ Hz), 0,90 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 0,85 (3H, s, H-20).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NO}_5$ 396,2744; obtido 396,2726 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

FM: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5$ **MM:** 378,5

3.6.2. Preparação de **VM-07**

Uma solução de **AC** (115 mg; 0,378 mmol) dissolvida em 8 mL de DCM foi resfriada até 0°C e então adicionado mCPBA (200 mg, 1,13 mmol) sob agitação. A solução foi mantida sob agitação por 24 h a 0°C , sendo finalizada com solução saturada NaHCO_3 (20 mL). A fase orgânica foi lavada com a mesma solução por 3 vezes, seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada em um evaporador rotativo. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 9:1) para obtenção de **VM-07**.



IV (KBr, cm^{-1}): 3660 a 2400 (O-H), 2937 (C-H), 1691 (C=O), 1640 (C=C) e 1252 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,68$ (1H, sl, H-14), 2,75 (1H, dd, $J = 4,3$ e $1,7$ Hz, H-17b), 2,52 (1H, d, $J = 4,3$ Hz, H-17a), 2,31 (1H, m, H-12), 2,14 (3H, d, $J = 1,0$ Hz, H-16), 2,06 (1H, m, H-12), 1,87 (1H, m, H-7), 1,86 (1H, m, H-11), 1,75 (1H, m, H-1), 1,56 (1H, m, H-2), 1,49 (1H, m, H-2), 1,41 (1H, m, H-3), 1,39 (1H, m, H-9), 1,36 (1H, m, H-7), 1,20 (1H,

m, H-3), 1,05 (1H, m, H-1), 1,04 (1H, m, H-5), 0,90 (3H, s, H-19), 0,83 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, s, H-20).

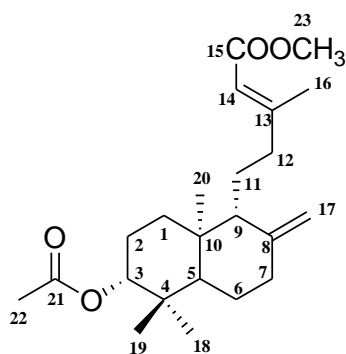
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,6$ (C-15), 163,9 (C-13), 114, 8 (C-14), 59,1 (C-8), 55,1 (C-5), 53,4 (C-9), 50,9 (C-17), 42,9 (C-12), 42,0 (C-3), 40,5 (C-10), 39,1 (C-1), 36,6 (C-7), 33,6 (C-4), 33,5 (C-19), 21,9 (C-11), 21,8 (C-18), 20,0 (C-6), 19,4 (C-16), 18,8 (C-2), 14,8 (C-20).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{NaO}_3$ 343,2244; obtido 343,2233 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

FM: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ **MM:** 320,47

3.6.3. Preparação de **VM-09**

Ao diterpeno **AAC** (50 mg, 0,138 mmol), em acetona seca (0,7 mL), à temperatura de 65°C , sob atmosfera de N_2 , foi adicionado iodometano (CH_3I - 0,03 mL, 0,413 mmol) e carbonato de potássio (K_2CO_3 - 50 mg, 0,344 mmol), sob agitação. Após 1 hora, foi adicionado DCM e a mistura reacional foi lavada com HCl 1 N e água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 8:2) para obtenção de **VM-09**.



IV (KBr, cm^{-1}): 2949 (C-H), 1734 (C=O), 1722 (C=O), 1647 (C=C), 1246 (C-O) e 1149 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,64$ (1H, sl, H-14), 4,87 (1H, sl, H-17b), 4,51 (1H, m, H-17a), 4,52 (1H, m, H-3), 3,69 (3H, s, H-23), 2,41 (1H, ddd, $J = 12,9; 4,1$ e $2,5$ Hz, H-7), 2,27 (1H, m, H-12), 2,16 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, H-16), 2,05 (3H, s, H-22), 1,93 (2H, td, $J = 12,4, 4,3$ Hz, H-7 e H-12), 1,6 (1H, m, H-1), 1,73 (1H, m, H-2), 1,72 (1H, m, H-6), 1,65 (1H, m, H-11), 1,61 (1H, m, H-2), 1,56 (1H, m, H-9), 1,55 (1H, m, H-11), 1,39 (1H, m, H-6), 1,26 (1H, m, H-1), 1,16 (1H, m, H-5), 0,87 (3H, s, H-18), 0,85 (3H, s, H-19), 0,71 (3H, s, H-20).

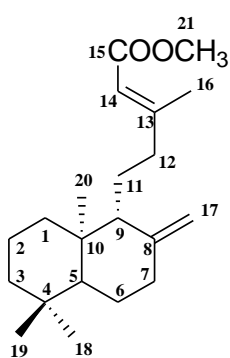
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171, 1$ (C-21), 167,3 (C-15), 160,9 (C-13), 147,5 (C-8), 115,1 (C-14), 107,0 (C-17), 80,7 (C-3), 55,8 (C-9), 54,8 (C-5), 50,9 (C-23), 39,7 (C-12), 39,3 (C-10), 38,2 (C-4), 38,1 (C-7), 36,8 (C-1), 28,3 (C-18), 24,3 (C-2), 23,9 (C-6), 21,7 (C-11), 21,4 (C-22), 19,0 (C-16), 16,6 (C-19), 14,6 (C-20).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{NO}_4$ 394,2952; obtido 394,2954 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_4$ **MM:** 376,53

3.6.4. Preparação de **VM-11**

AC (80 mg, 0,26 mmol), em acetona seca (1,12 mL) foi mantido a temperatura de 65 °C, sob atmosfera de N₂. Em seguida foi adicionado CH₃I (0,05 mL, 0,79 mmol) e K₂CO₃ (90 mg, 0,65 mmol) sob agitação. Após 1 hora, foi adicionado DCM e a mistura reacional foi lavada com HCl 1 N e água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 9:1) para obtenção de **VM-11**.



IV (KBr, cm⁻¹): 2923 (C-H), 1722 (C=O), 1648 (C=C), 1435 (O-H), 1225 (C-O) e 1148 (C-O).

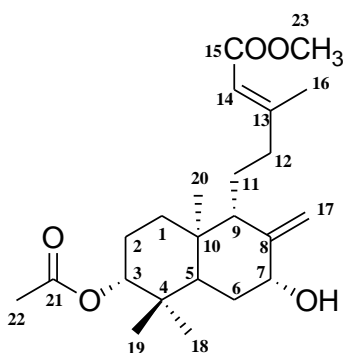
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,65 (1H, sl, H-14), 4,84 (1H, sl, H-17b), 4,49 (1H, sl, H-17a), 3,68 (3H, s, H -21), 2,40 (1H, m), 2,35 – 2,24 (1H, ddd, J = 13,8; 10,1; 3,9 Hz), 2,15 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-16), 2,02 – 1,91 (2H, m), 1,78 – 1,67 (3H, m), 1,66 – 1,58 (2H, m), 1,57 – 1,47 (3H, m), 1,48 – 1,35 (1H, m), 1,35 – 1,23 (1H, m), 1,23 – 1,15 (1H, m), 1,10 (1H, d, J = 2.7 Hz), 1,06 - 0,98 (1H, m), 0,87 (3H, s, H-18), 0,80 (3H, s, H-19), 0,68 (3H, s, H-20).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 167,4 (C-15), 161,4 (C-13), 148,4 (C-8), 114,9 (C-14), 106,4 (C-17), 56, 2 (C-9), 55, 6 (C-5), 50,9 (C-21), 42,2 (C-3), 39,9 (C-1), 39,8 (C-10), 39,1 (C-12), 38,4 (C-7), 33,7 (C-4), 33,6 (C-18), 24,5 (C-6), 21,8 (C-19), 21,6 (C-11), 19,5 (C-2), 19,0 (C-16), 14,6 (C-20).

FM: C₂₁H₃₄O₂ **MM:** 318,49

3.6.5. Preparação de **VM-12**

A uma solução de dióxido de selênio (SeO₂ – 7 mg, 0,065 mmol), em DCM (0,33 mL), adicionou-se hidróperóxido de terc-butila 5,5 M (t-BuOOH - 0,047 mL, 0,26 mmol), sendo a mistura mantida sob agitação por 1 hora. Em seguida a solução de **VM-09** (50 mg, 0,13 mmol), em DCM (0,067 mL), foi acrescentada e a mistura mantida sob agitação por 24 horas. Ao final, a reação foi diluída em uma solução saturada de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) e extraída com AcOEt. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) para obtenção de **VM-12**.



IV (KBr, cm^{-1}): 3497 (O-H), 2949 (C-H), 1730 (C=O), 1700 (C=O), 1647 (C=C), 1246 (C-O), 1235 (C-O) e 1152 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 5,64 (1H, sl, H-14), 5,09 (1H, sl, H-17b), 4,65 (1H, sl, H-17a), 4,56 (1H, dd, J = 11, 8 e 4,3 Hz, H-3), 4,40 (1H, m, H-7), 3,69 (3H, s, H-23), 2,26 (1H, ddd, J = 13,8; 10,0 e 4,0 Hz, H-12), 2,15 (3H, d, J = 1,2 Hz, H-16), 2,10 (1H, m, H-9), 2,05 (3H, s, H-22), 1,97 (1H, m, H-12),

1,87 (1H, m, H-6), 1,84 (1H, m, H-11), 1,79 (1H, m, H-2b), 1,78 (1H, m, H-1), 1,75 (1H, m, H-11), 1,73 (1H, m, H-5), 1,61 (1H, s, H-2a), 1,59 (1H, m, H-6), 1,33 (1H, m, H1), 0,88 (3H, s, H-19), 0,85 (3H, s, H-18), 0,69 (3H, s, H-20).

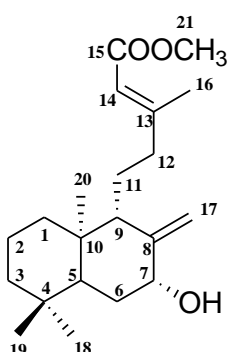
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 171,0 (C-21), 167,2 (C-15), 160,4 (C-13), 148,9 (C-8), 115,2 (C-14), 110,2 (C-17), 80,7 (C-3), 73,7 (C-7), 50,9 (C-23), 49,9 (C-9), 47,0 (C-5), 39,5 (C-10), 39,3 (C-12), 37,6 (C-4), 36,6 (C-1), 30,5 (C-6), 28,1 (C-19), 24,3 (C-2), 21,4 (C-11), 21,2 (C-22), 18,9 (C-16), 16,5 (C-18), 13,6 (C-20).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{NaO}_5$ 415,2455; obtido 415,2453 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5$ **MM:** 392,53

3.6.6. Preparação de **VM-13**

A uma solução de SeO_2 (6 mg, 0,06 mmol) em DCM (0,30 mL) adicionou-se *t*-BuOOH 5,5 M (0,049 mL, 0,25 mmol), sendo mistura mantida sob agitação por 1 hora. Em seguida a solução de **VM-11** (40 mg, 0,12 mmol), em DCM (0,060 mL), foi acrescentada e a mistura mantida sob agitação, por 24 horas. Ao final, a reação foi diluída em uma solução saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e extraída com AcOEt. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada. O produto obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano:AcOEt, 8:2) para obtenção de **VM-13**.



IV (KBr, cm^{-1}): 3454 (O-H), 2936 (C-H), 1721 (C=O), 1648 (C=C), 1226 (C-O) e 1148 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 5,65 (1H, sl, H-14), 5,07 (1H, sl, H-17b), 4,63 (1H, sl, H-17a), 4,38 (1H, m, H-7), 3,68 (3H, s, H-21), 2,26 (1H, m, H-12), 2,16 (3H, d, J = 1,2 Hz, H-16), 2,12 (1H, m, H-9), 1,98

(1H, m, H-12), 1,88 (1H, dd, $J = 10, 7$ e $2, 6$ Hz, H-6), 1,80 (1H, m, H-2), 1,74 (1H, m, H-1), 1,60 (1H, m, H-5), 1,55 (1H, m, H-6), 1,52 (1H, m, H-2), 1,51 (1H, m, H-11), 1,44 (1H, m, H-3), 1,27 (1H, m, H-3), 1,13 (1H, td, $J = 12, 7$ e $4, 5$ Hz, H-1), 0,88 (3H, s, H-19), 0,80 (3H, s, H-18), 0,66 (3H, s, H-20).

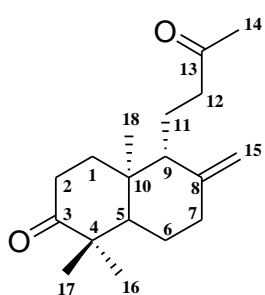
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 167,3$ (C-15), 160,9 (C-13), 149,5 (C-8), 115,1 (C-14), 109,8 (C-17), 74,1 (C-7), 50,9 (C-21), 50,3 (C-9), 47,7 (C-5), 42,1 (C-3), 40,0 (C-10), 39,5 (C-12), 38,9 (C-1), 33,4 (C-4), 33,2 (C-19), 31,1 (C-6), 21,6 (C-18), 21,1 (C-2), 19,4 (C-11), 18,9 (C-16), 13,5 (C-20).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{NO}_3$ 352,2846; obtido 352,2846 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$ **MM:** 334,49

3.6.7. Preparação de **VM-18**

A um balão de 25 mL adicionou-se clorocromato de piridínio (PCC - 67,5 mg, 0,31mmol), carbonato de bário (BaCO_3 - 46,2 mg, 0,23 mmol) e DCM seco (0,2 mL). A mistura permaneceu sob agitação por 5 minutos e em seguida **AHC** (50 mg, 0,156 mmol) foi adicionada, dissolvida em 0,2 mL de DCM, mantendo-se a agitação por 3 h. A mistura foi então diluída com éter etílico, vertida sobre uma coluna de vidro sinterizado preenchida com Florisil® e eluída com 200 mL da mistura de solventes hexano:AcOEt (7:3). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3), levando ao isolamento de **VM-18**.



IV (KBr, cm^{-1}): 2924 (C-H), 1709 (C=O) e 1645 (C=C).

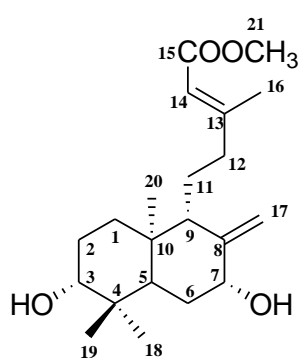
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,91$ (1H, sl, H-15b), 4,52 (1H, sl, H-15a), 2,59 (1H, m, H-2), 2,57 (1H, m, H-12), 2,45 (1H, m, H-7), 2,39 (1H, m, H-12), 2,38 (1H, m, H-7), 2,38 (1H, m, H-2), 2,11 (3H, s, H-14), 1,98 (1H, m, H-1), 1,88 (1H, m, H-11), 1,69 (1H, m, H-6), 1,63 (1H, m, H-11), 1,61 (1H, m, H-5), 1,57 (1H, m, H-9), 1,55 (1H, m, H-1), 1,51 (1H, td, $J = 11,9, 3,8$ Hz, H-6), 1,09 (3H, s, H-17), 1,02 (3H, s, H-16), 0,87 (3H, s, H-18).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 216,9$ (C-3), 209,1 (C-13), 147,1 (C-8), 107,7 (C-15), 55,2 (C-9), 55,3 (C-5), 47,8 (C-4), 42,6 (C-12), 39,5 (C-10), 37,9 (C-7), 37,6 (C-1), 34,8 (C-2), 30,2 (C-14), 26,1 (C-17), 25,1 (C-6), 21,8 (C-16), 17,9 (C-11), 14,0 (C-18).

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NaO}_2$ 299,1982; obtido 299,1986 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.8. Preparação de **VM-20**

A uma solução de **VM-12** (30 mg, 0,076 mmol) em metanol (MeOH - 0,82 mL) foi adicionado uma solução aquosa de hidróxido de sódio (40% p/v) (NaOH - 0,023 mL, 0,23 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação durante 24 h. Em seguida a mistura foi neutralizada com HCl 1 M e extraída com CH₂Cl₂ por duas vezes. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3), levando ao isolamento de **VM-20**.

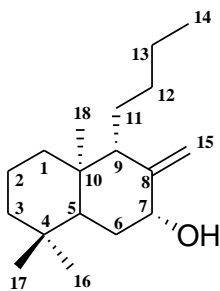


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,65 (1H, sl, H-14), 5,08 (1H, sl, H-17b), 4,64 (1H, sl, H-17a), 4,37 (1H, m, H-7), 3,69 (3H, s, H-21), 3,27 (1H, m, H-3), 2,89 (5H, s), 2,26 (1H, m), 2,15 (3H, d, *J* = 1,0 Hz, H-16), 2,14 (1H, d, *J* = 1,0 Hz), 2,12 - 2,02 (2H, m), 2,01 - 1,93 (1H, m), 1,89 - 1,85 (1H, m), 1,82 - 1,77 (1H, m), 1,75 - 1,65 (3H, m), 1,63 - 1,57 (3H, m), 1,29 - 1,22 (2H, m), 0,99 (3H, s, H-19), 0,77 (3H, s, H-18), 0,67 (3H, s, H-20).

FM: C₂₁H₃₄O₄ **MM:** 350,49

3.6.9. Preparação de **VM-21**

A uma solução de **VM-13** (20 mg, 0,060 mmol) em MeOH (0,65 mL) foi adicionado uma solução aquosa de NaOH (40% p/v) (0,018 mL, 0,18 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação durante 24 h. Em seguida a mistura foi neutralizada com HCl 1 M e extraída com CH₂Cl₂ por duas vezes. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3), levando ao isolamento de **VM-21**.



IV (KBr, cm⁻¹): 3437 (O-H), 2926 (C-H), 1646 (C=C) e 1387 (O-H).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,05 (1H, sl, H-15b), 4,61 (1H, sl, H-15a), 4,36 (1H, m, H-7), 2,20 (1H, m, H-1), 2,08 (1H, s, H-9), 2,08 (3H, s, H-14), 2,02 (1H, m, H-1), 1,85 (1H, s, H-6), 1,72 (1H, m, H-12), 1,70 (1H, m, H-2), 1,58 (1H, m, H-5), 1,54 (1H, m, H-6), 1,53 (1H, m, H-11), 1,46 (1H, m, H-2), 1,40 (1H, m, H-3), 1,25 (1H, m, H-13), 1,23 (1H, m,

H-3), 1,07 (1H, m, H-12), 0,87 (3H, s, H-17), 0,79 (3H, s, H-16), 0,66 (3H, s, H-18).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 149,5 (C-8), 109,7 (C-15), 74,0 (C-7), 49,6 (C-9), 47,7 (C-5), 42,1 (C-3), 39,9 (C-10), 39,1 (C-1), 38,8 (C-12), 33,4 (C-17), 33,2 (C-4), 31,2 (C-6), 29,8 (C-13), 21,6 (C-16), 20,6 (C-2), 19,5 (C-11), 18,5 (C-14), 13,6 (C-18).

FM: $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$ **MM:** 264,45

3.7. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Diterpenos naturais e semissintéticos (tabela 7) foram avaliados quanto à potencial atividade anti-inflamatória, citotóxica e antibacteriana.

Tabela 7: Substâncias utilizadas nos ensaios de atividade biológica.

Substâncias	Naturais	Derivados semissintéticos	Atividade Avaliada		
			Anti- inflamatória	Citotóxica	Antibacteriana
AC	X		X	X	X
AAC	X		X	X	X
AHC	X		X	X	X
COP1	X		X	X	
VM-03		X	X	X	X
VM-07		X	X	X	X
VM-09		X	X	X	X
VM-11		X	X	X	X
VM-12		X	X	X	X
VM-13		X	X	X	X
VM-18		X	X	X	X
VM-20		X			
VM-21		X	X	X	X

Fonte: Própria autora.

3.7.1. Atividade anti-inflamatória

A avaliação da potencial atividade anti-inflamatória de diterpenos naturais e semissintéticos foi realizada através de colaboração com o Laboratório de Imunologia da

Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, sob a coordenação da professora Dra. Sandra Bertelli de Castro.

Inicialmente, a citotoxicidade de diterpenos naturais e semissintéticos foi avaliada em culturas de macrófagos RAW264.7, nas concentrações de 25, 50 e 100 μM . Em seguida, utilizando a mesma linhagem celular, as substâncias foram avaliadas quanto à inibição da produção de NO, indiretamente determinada pela dosagem de nitrito, através do método de Griess.

3.7.1.1.Cultura celular

Macrófagos RAW264.7 (2×10^5 células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e 5% de soro fetal bovino, mantidos a 37 °C em 5% de CO_2 . As células foram estimuladas ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN- γ (0,9 ng/mL), cultivadas por 3, 24 ou 48 horas na presença ou ausência de diterpenos naturais ou semissintéticos, nas concentrações de 25, 50 e 100 μM . Para controle, as seguintes culturas foram realizadas: células estimuladas ou não sem os tratamentos, células estimuladas ou não na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (veículo).

3.7.1.2.Avaliação *in vitro* da citotoxicidade frente a células RAW264.7

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - Sigma, St, Louis, MO, USA). Para o teste, após o tempo necessário de cultivo o sobrenadante de cada poço foi removido, 100 μL de RPMI e 10 μL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 e após o período de 4 horas a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100 μL de DMSO.

3.7.1.3.Avaliação *in vitro* da potencial atividade anti-inflamatória

A concentração de óxido nítrico (NO - indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess, no sobrenadante de 48 horas de cultura de macrófagos RAW264.7. As células foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN- γ (0,9 ng/mL) e então incubadas na presença de diterpenos naturais ou semissintéticos, nas

concentrações de 25, 50 e 100 μM , por 48 horas. Para controle foram utilizadas células não tratadas, estimuladas ou não estimuladas.

Para determinação da potencial atividade anti-inflamatória, 100 μL do sobrenadante de cada poço foi transferido para placas de 96 poços, onde foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etilenodiamina, 5% H_3PO_4 , Sigma, St, Louis, MO, USA). A produção de nitrito foi quantificada pela comparação a uma curva padrão com diferentes concentrações de NaNO_2 , gerada a partir dos valores de absorbância obtidos a 540 nm. A produção de NO foi calculada levando em consideração o controle de produção, ou seja, células RAW264.7 que foram estimuladas com LPS e IFN- γ mas que não foram submetidas ao tratamento com as substâncias naturais ou semissintéticas (CASTRO et al., 2012; CORRÊA et al., 2013).

3.7.2. Atividade citotóxica

A avaliação da potencial atividade citotóxica de diterpenos naturais e semissintéticos foi avaliada através de colaboração com o Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, sob a coordenação da professora Dra. Sandra Bertelli de Castro. A viabilidade celular de células A549 tratadas com as substâncias naturais e semissintéticas, nas concentrações de 25, 50 e 100 μM , foi determinada pelo método colorimétrico MTT.

3.7.2.1. Cultura celular

Células de adenocarcinoma alveolar humano (A549) (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e 5% de soro fetal bovino, mantidas a 37 °C em 5% de CO_2 . As células foram cultivadas por 24 e 48 horas na presença ou ausência de diterpenos naturais ou semissintéticos, nas concentrações de 25, 50 e 100 μM . Para controle, foram utilizadas culturas de células não tratadas na presença ou não de DMSO 1% (veículo).

3.7.2.2. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica frente a células A549

A viabilidade das células A549 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - Sigma, St, Louis, MO, USA). Após o tempo determinado de cultivo (24 ou 48 horas), o sobrenadante de cada poço foi removido, 100 µL de RPMI e 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100 µL de DMSO.

3.7.3. Atividade antibacteriana

A avaliação da potencial atividade antibacteriana de diterpenos naturais e semissintéticos foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, sob a coordenação do professor Dr. Fábio Alessandro Pieri. A determinação da atividade antibacteriana das substâncias naturais e semissintéticas frente a espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia* foi realizada através do ensaio de CIM, por microdiluição, nas concentrações de 800 a 1,56 µM.

3.7.3.1. Micro-organismos

Para avaliação, *in vitro*, da atividade antibacteriana de diterpenos naturais e semissintéticos foram utilizadas 6 espécies bacterianas, sendo cinco Gram-positivas e uma Gram-negativa (Tabela 8). Todas as espécies utilizadas pertencem à Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Microbiologia da UFJF/GV.

Tabela 8: Espécies bacterianas.

Micro-organismos	Código de origem	Morfotipo
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	CCT 2564	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	CDC O126	Gram (-)
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC 10449	Gram (+)
<i>Streptococcus mutans</i>	CCT 3440	Gram (+)
<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 12261	Gram (+)
<i>Streptococcus salivarius</i>	NCTC 8618	Gram (+)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	NCTC 7863	Gram (+)

Fonte: Própria autora.

3.7.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição

A CIM das substâncias naturais e semissintéticas foi avaliada frente às espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Escherichia*, conforme proposto pelo documento M07-A9 do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, com modificações (CLSI, 2012; SOUZA et al., 2011a). Os inóculos foram preparados a partir de culturas de bactérias, incubadas a 37 °C, por 24 h em placas de petri contendo meio TSA para espécies do gênero *Streptococcus* e meio Ágar Muller Hinton (MH) para as demais. As suspensões bacterianas foram preparadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina esterilizada de acordo com a escala 0,5 de McFarland, correspondendo à concentração de $1,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (densidade óptica 0,1 a 550 nm). Posteriormente cada suspensão bacteriana foi diluída para $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, obtendo assim o inóculo padronizado.

As substâncias foram solubilizadas em DMSO na concentração de 1 mg/mL e posteriormente foram feitas diluições seriadas em caldo TSB ou MH de modo que as concentrações das amostras variassem de 1600 a 3,125 μ M. Alíquotas de 50 μ L de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços.

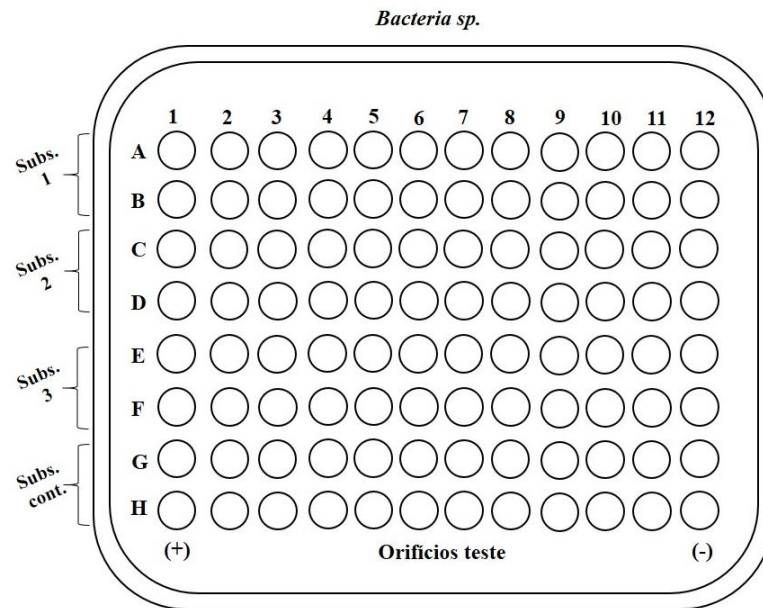
Utilizou-se como controle a clorexidina (**CL**) para as espécies do gênero *Streptococcus* e a ampicilina (**AP**) para as demais espécies. Os fármacos foram solubilizados em água destilada estéril na concentração de 1 mg/mL e posteriormente foram feitas diluições seriadas em caldo TSB ou MH de modo que as concentrações das amostras variassem de 400 a 0,7812 μ M.

Na primeira coluna preparou-se o controle positivo (de crescimento) constituído de 50 μ L do inóculo bacteriano com 50 μ L de caldo TSB ou MH. Na última coluna preparou-se o controle negativo (esterilidade) com 100 μ L de TSB ou MH.

A cada orifício teste foram acrescentados 50 μ L de inóculo bacteriano (Figura 12).

As placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Espécies do gênero *Streptococcus* foram mantidas em jarras de anaerobiose. A leitura foi realizada visualmente na ausência e presença de 50 μ L da solução de resazurina 0,01% (CLSI, 2012). A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu 100% do crescimento bacteriano. Os resultados foram expressos em μ g/mL e o experimento foi realizado em duplicata.

Figura 12: Delineamento experimental do ensaio de Concentração Inibitória Mínima por microdiluição.



Fonte: Própria autora.

Notas: (+) controle positivo; (-) controle negativo; (**Subs.**) substância; (**Subs. cont.**) substância controle.

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados de atividade citotóxica e anti-inflamatória apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes e são mostrados como média \pm desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de Student, teste de Mann-Whitney e ANOVA, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DITERPÊNICA ÁCIDA

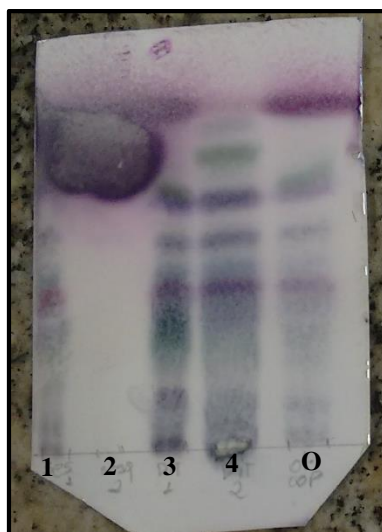
O oleorresina de *C. langsdoffii* é composto predominantemente por terpenos, em especial sesquiterpenos e diterpenos. Um estudo desenvolvido por Xavier-Junior e colaboradores (2017) mostrou que 93% das substâncias detectadas em ORC eram terpenos, sendo 44,8% sesquiterpenos e 48,2% diterpenos. Um segundo estudo evidenciou que a porção volátil do oleorresina era composta majoritariamente por sesquiterpenos (96,36%), enquanto a porção resinosa era constituída em sua maioria por diterpenos (44,73%) e sesquiterpenos (31,74%) (GELMINI et al., 2013).

No presente trabalho, o oleorresina de copaíba foi submetido inicialmente à partição líquido-líquido. Cerca de 90 g de ORC foi dissolvido em 250 mL de éter etílico e extraído com 125 mL de solução aquosa de KOH (5%, v/v). A fase aquosa foi separada, acidificada a pH 3 com HCl concentrado e submetida novamente à partição com éter etílico (150 mL). A fração orgânica foi então concentrada em evaporador rotatório para obtenção de 3 g da FDAc1, representando um rendimento final de 3,3%.

A segunda metodologia foi desenvolvida utilizando coluna *flash* com sílica impregnada com KOH. Foram realizadas seis colunas, utilizando cerca de 38 g de ORC em cada uma delas e hexano (1500 mL), seguido de metanol (1000 mL) como fase móvel. A partir de 228 g de amostra foram obtidos 29 g da FDAc2, representando um rendimento de 12,7%.

Os procedimentos descritos acima foram empregados com o objetivo de se obter a fração diterpênica ácida (FDAc) devido a presença predominante de diterpenos ácidos, que foram os diterpenos de interesse. (ROMERO, 2007; SILVA, et al., 2016). Como pode ser observado no cromatograma (Figura 13), a segunda metodologia mostrou maior eficiência no processo de obtenção da FDAc, além de ter apresentado melhor rendimento. Essa eficiência pode ser observada pelo perfil cromatográfico das frações não-ácida (FNA) e ácida (FDAc) obtidas em ambas metodologias.

Figura 13: Análise cromatográfica das frações não-ácida, ácida e do oleorresina de *C. langsdorffii*.



Fonte: Própria autora.

Notas: (1) - Fração não-ácida 1 (FNA1); (2) – Fração não-ácida 2 (FNA2); (3) – Fração diterpênica ácida 1 (FDAc1); (4) - Fração diterpênica ácida 2 (FDAc2); (O) – ORC. **Fase estacionária:** sílica-gel F254; **Fase Móvel:** Hexano:AcOEt (85:15, v/v); **Revelador:** anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (100°C).

No cromatograma da figura 13 tem-se a comparação entre as frações ácidas (FDAc) e não-ácidas (FNA) das metodologias utilizadas para obtenção da fração diterpênica ácida. Nota-se que o perfil cromatográfico da FNA1 (1) é semelhante ao perfil cromatográfico de ORC (O), ou seja, a metodologia 1 foi pouco eficiente para a separação da fração não-ácida e ácida. Além disso, percebe-se que FNA1 (1) também possui perfil semelhante ao ORC, com a presença de manchas ao longo de todo cromatograma. Na análise das amostras obtidas com a metodologia 2, percebe-se um perfil cromatográfico diferente entre as frações FNA2 (2), FNA2 (4) e ORC. FNA2 apresenta apenas substâncias apolares em sua composição, como pode ser observado no fronte do cromatograma. FNA2 não apresenta a mesma mancha em sua parte superior, sendo observadas manchas ao longo de quase toda placa, indicando assim a presença de diterpenos ácidos e um sucesso na obtenção da FNA.

Dois trabalhos também utilizaram a partição líquido-líquido para a separação da FNA e FNA, alcançando rendimentos entre 18,3 e 28% para a fração diterpênica ácida (LAMA et al., 2014; ROMERO, 2007). Comparando esses resultados com os obtidos no presente estudo, percebe-se que há uma diferença relevante entre os valores de rendimentos obtidos. Essa diferença, além de ser atribuída à técnica, pode também ser atribuída à composição do próprio oleorresina. Ambos estudos citados não descreveram a espécie de *Copaifera* utilizada,

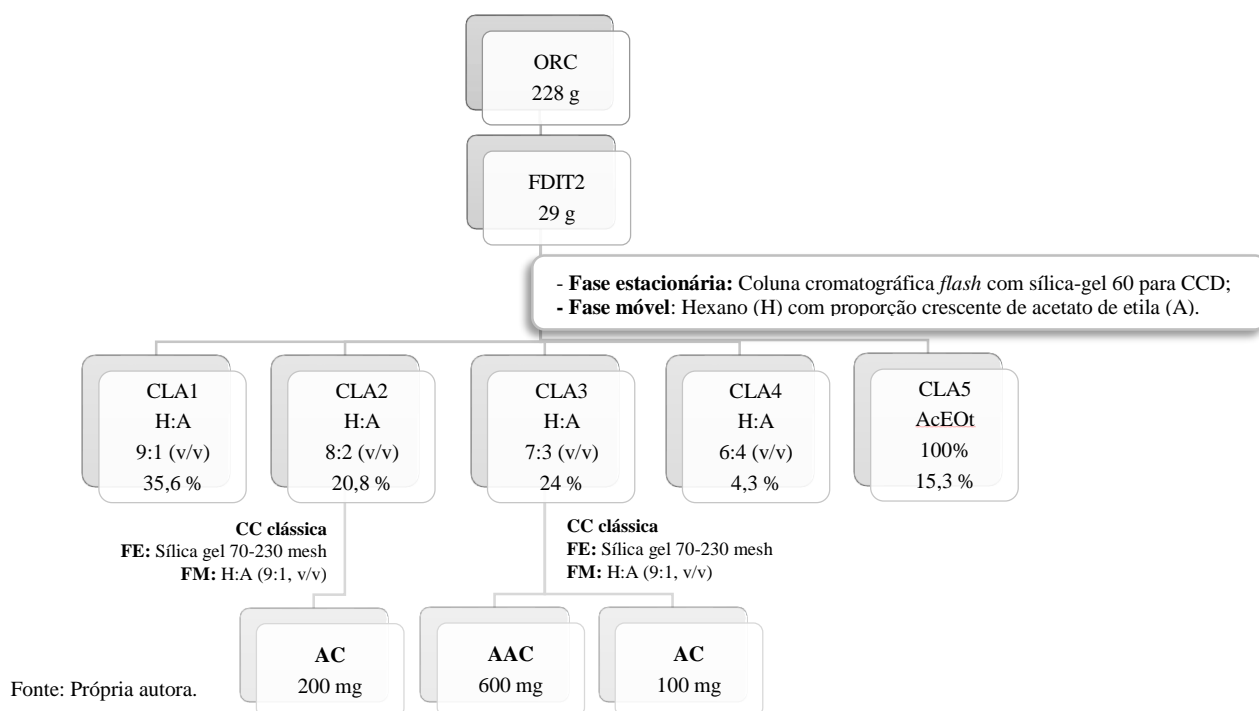
constando apenas a informação de origem comercial. Diversos fatores relacionados à biossíntese dos constituintes do óleo de copaíba podem influenciar diretamente no rendimento, como variações químicas inter e intra espécies em decorrência de fatores bióticos externos, genéticos, climáticos e condições de colheita (ARRUDA et al., 2019; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

4.2. ISOLAMENTO DE DITERPENOS E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

FDAc1 (3 g) foi submetida à CCC utilizando o sistema de solventes hexano:AcOEt (90:10, v/v) como fase móvel, originando 20 frações (F1-F20). A partir dessa coluna foi possível isolar 80 mg de ácido 3-acetóxi-copálico (**AAC**, 2,67%), 67 mg de ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**, 2,23%) e 19 mg de ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico (**COPI**, 0,63%). A fração F06 (275 mg) foi submetida a uma nova CCC que permitiu o isolamento de 59 mg de ácido copálico (**AC**, 1,97%).

FDAc2 foi inicialmente submetida à coluna *flash*, sendo obtidas 5 frações (CLA1 – CLA5). A fração CLA2 (7 g) foi submetida a sucessivas CCC, utilizando hexano:AcOEt (90:10, v/v) como fase móvel, permitindo o isolamento de 200 mg de **AC**. A fração CLA3 (8 g) também foi submetida a sucessivas CCC, possibilitando o isolamento de 600 mg de **AAC** (7,5%) e 100 mg de **AC** (1,25%), conforme fluxograma 4 abaixo.

Fluxograma 4: Isolamento de **AAC** e **AC** a partir de FDAc2.

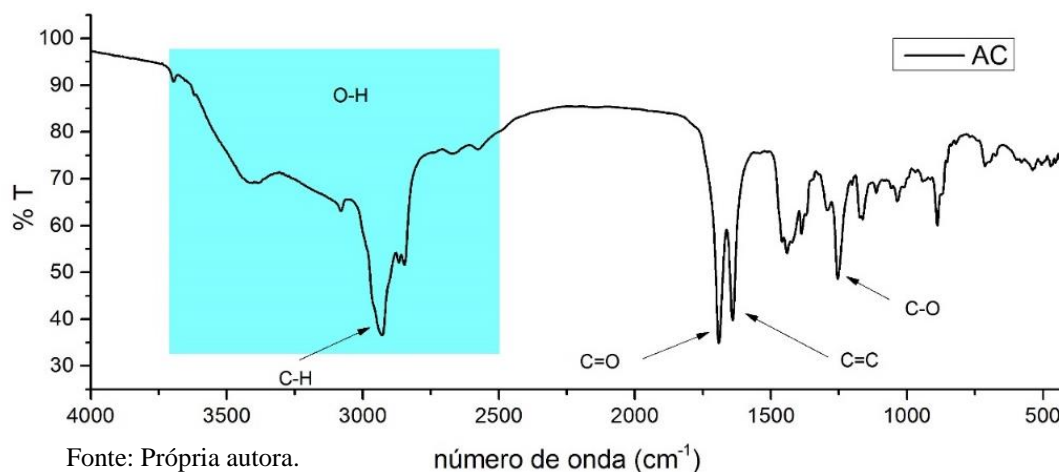


A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada com base em espectros no IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , correlações bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC), massas e, quando possível, confirmada através da comparação com dados disponíveis na literatura.

A estrutura do ácido copálico (**AC**), diterpeno labdano, considerado biomarcador do oleorresina de *Copaifera*, foi determinada a partir da análises espectrais e confirmada através da comparação com dados da literatura (CAVIN et al., 2006, VARGAS et al., 2015).

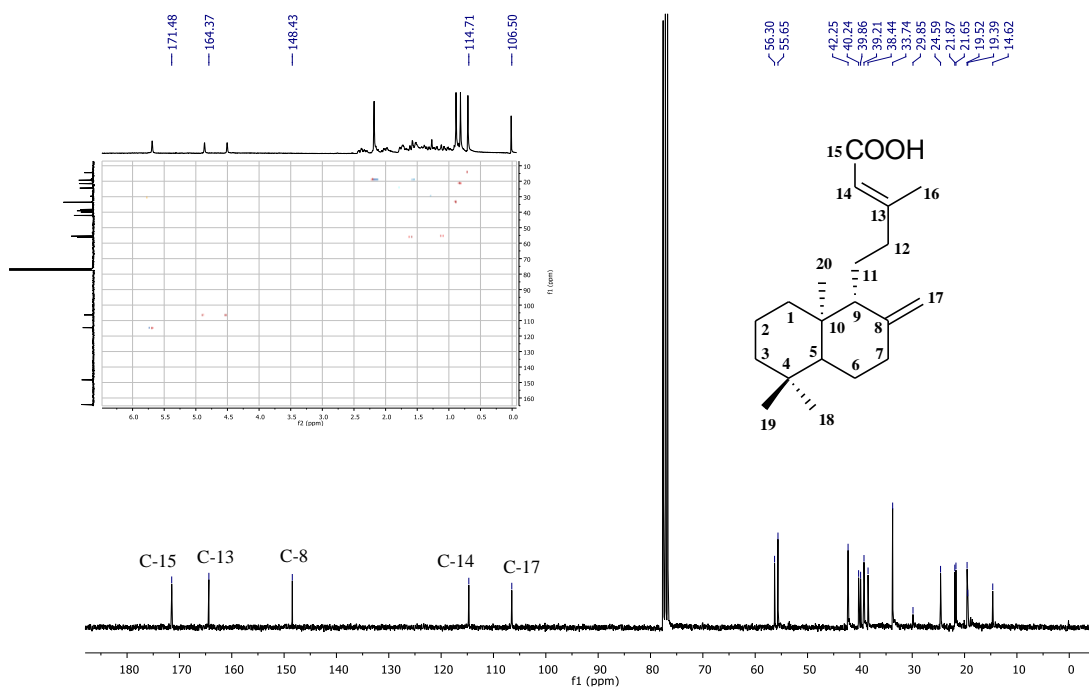
No espectro de IV de **AC** (Figura 14) foi possível observar bandas que apontam a presença de grupamento ácido e insaturações na substância, elementos característicos de diterpenos ácidos do tipo labdano. Percebe-se uma banda larga característica de ácido carboxílico na região de 3600 a 2500 cm^{-1} , referente à deformação axial de O-H. Além disso, nota-se a presença de bandas correspondentes às deformações axiais de C=O e C-O em 1690 e 1252 cm^{-1} , respectivamente, corroborando com a presença de grupamento ácido na estrutura da molécula. No espectro observa-se ainda uma banda com forte intensidade em 1640 cm^{-1} , sugerindo a presença de ligação C=C na molécula de **AC**.

Figura 14: Espectro no infravermelho (KBr) de **AC**.



Por meio dos espectros de RMN de ^{13}C e de HSQC-dept de **AC** (Figura 15) foi possível determinar a presença de 20 carbonos, sendo cinco quaternários, três metínicos, oito metilênicos e quatro metílicos. Valores de deslocamentos específicos de diterpenos labdanos são evidenciados nessa molécula, como a presença da dupla exocíclica [$148,4\text{ ppm}$ (C-8) e $106,5\text{ ppm}$ (C-17)], presença da carbonila [$171,4\text{ ppm}$ (C-15)] e a presença dos carbonos insaturados da cadeia lateral [$164,3\text{ ppm}$ (C13) e $114,7\text{ ppm}$ (C-14)].

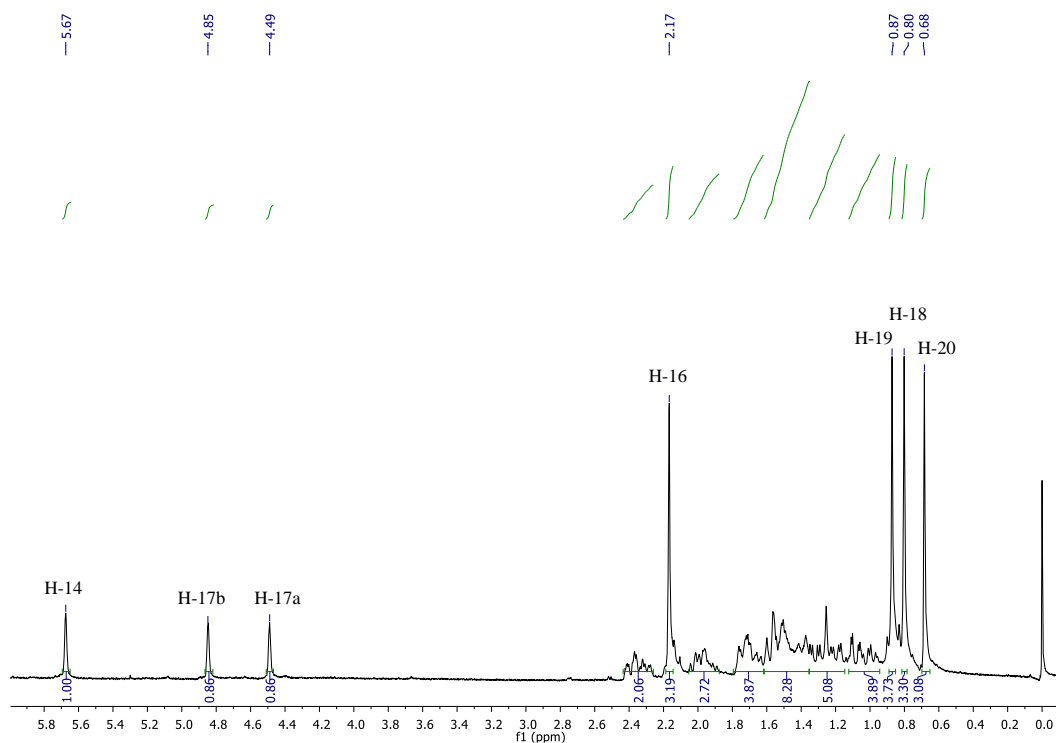
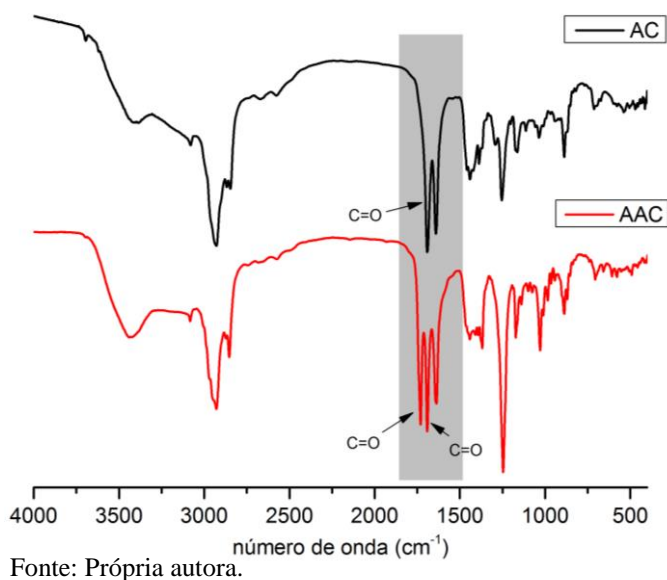
Figura 15: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de **AC**.



Fonte: Própria autora.

Na análise de RMN de ^1H de **AC** (Figura 16) destaca-se quatro simpletos de grupo metílico [2,17 ppm (Me-16), 0,87 ppm (Me-19), 0,80 ppm (Me-18) e 0,68 ppm (Me-20)], dois simpletos largos correspondentes aos hidrogênios do grupo exo-metilênico [4,85 e 4,49 ppm (H-17)] e um simpleto de hidrogênio do sistema olefínico da cadeia lateral [5,67 ppm (H-14)].

O espectro no IV de **AAC** também apresenta bandas que sugerem a presença de ácido carboxílico, carbonilas e insaturações na molécula, de maneira idêntica ao **AC**. Na comparação entre os espectros (Figura 17) a principal diferença observada entre as substâncias é a presença de um estiramento $\text{C}=\text{O}$ adicional (1730 cm^{-1}) em **AAC**, indicando a presença de mais uma carbonila na estrutura.

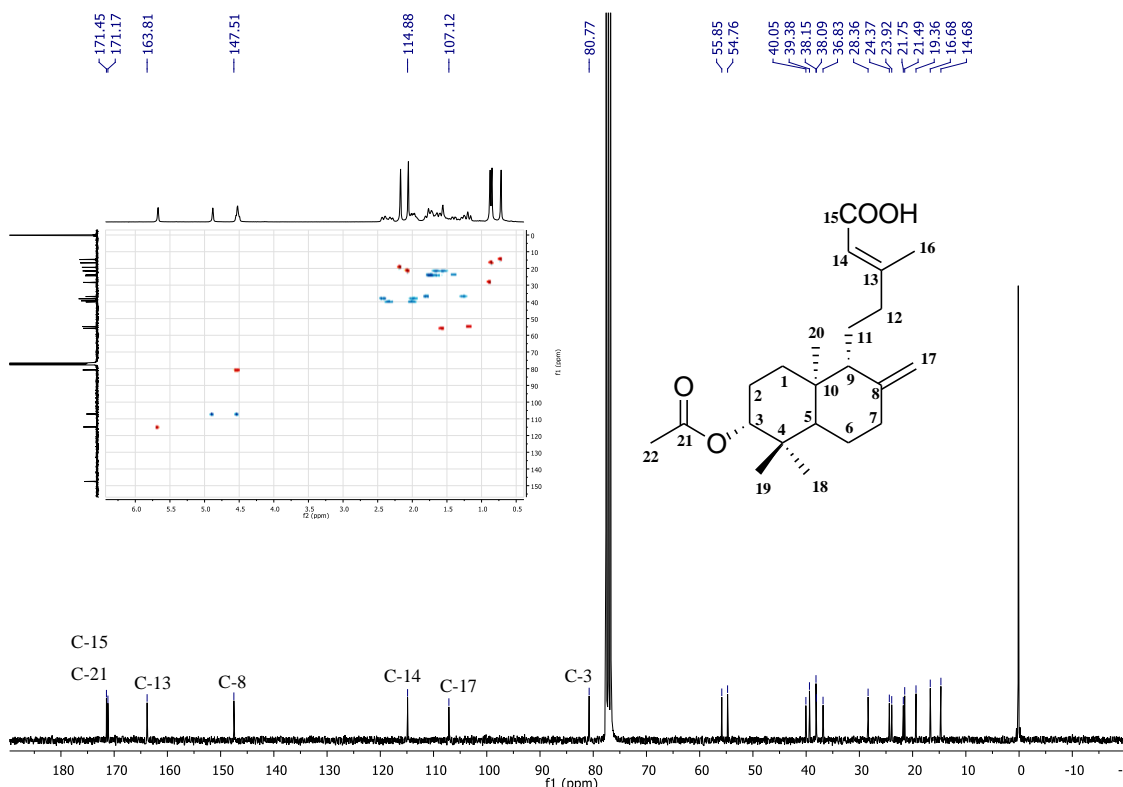
Figura 16: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AC**.**Figura 17:** Espectro no infravermelho (KBr) de **AC** e **AAC**.

A análise dos espectro de RMN de ^{13}C e HSQC-dept de **AAC** (Figura 18) permitiu identificar a presença de 22 carbonos, ou seja, dois carbonos a mais que o encontrado no espectro de **AC**. Dentre os 22 carbonos há a presença de seis quaternários, quatro metínicos,

sete metilênicos e cinco metílicos. O espectro HMBC permitiu atribuir aos sinais 171,4 e 171,1 ppm às carbonilas C-15 e C-21, respectivamente.

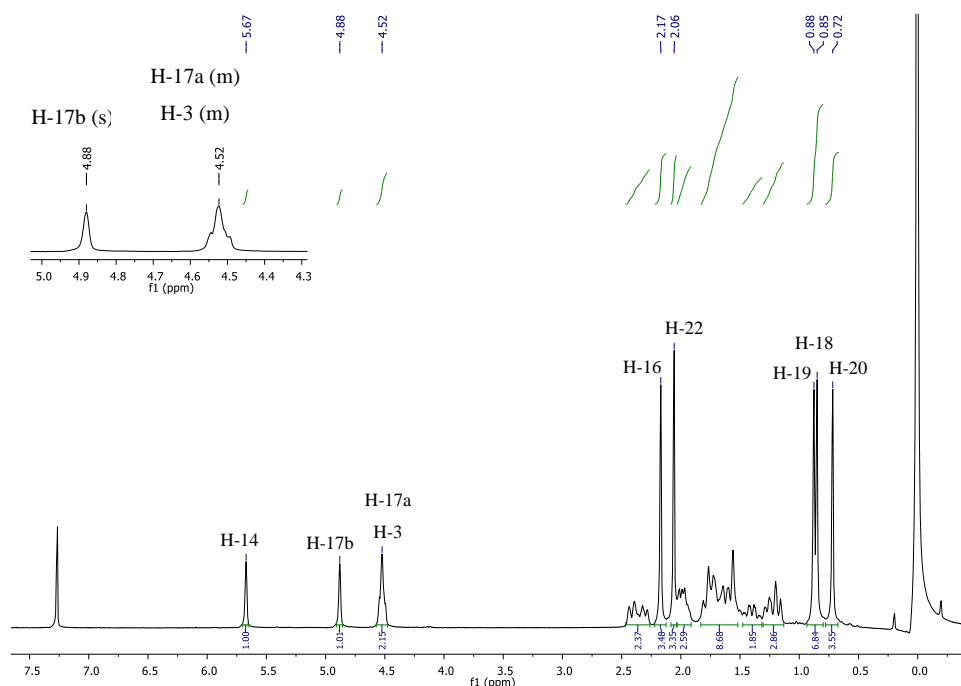
No espectro de RMN de ^{13}C observa-se também a presença dos carbonos com deslocamento 163,8, 147,5, 114,8 e 107,1 ppm, que indicam a presença de dois sistemas olefínicos na estrutura e que puderam ser facilmente associados a C-13, C-8, C-14, C-17, respectivamente. O núcleo labdânico pode ser confirmado pela presença de um simpleto em 5,67 ppm (H-14) e dois simpletos largos, relativos aos hidrogênios da dupla exocíclica [4,88 ppm (H-17b) e 4,52 ppm (H-17a)].

Figura 18: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de HSQC-dept e estrutura molecular de AAC.



No espectro de RMN de ^1H de AAC (Figura 19) observa-se ainda a presença de cinco simpletos correspondentes aos grupamentos metílicos [2,17 ppm (Me-16), 2,06 ppm (Me-22), 0,88 ppm (Me-19), 0,85 (Me-18) e 0,72 ppm (Me-20)], ou seja, um grupamento metílico a mais quando comparado ao AC. Vale destacar ainda a sobreposição de sinais na região de 4,52 ppm (H-3 e H-17a).

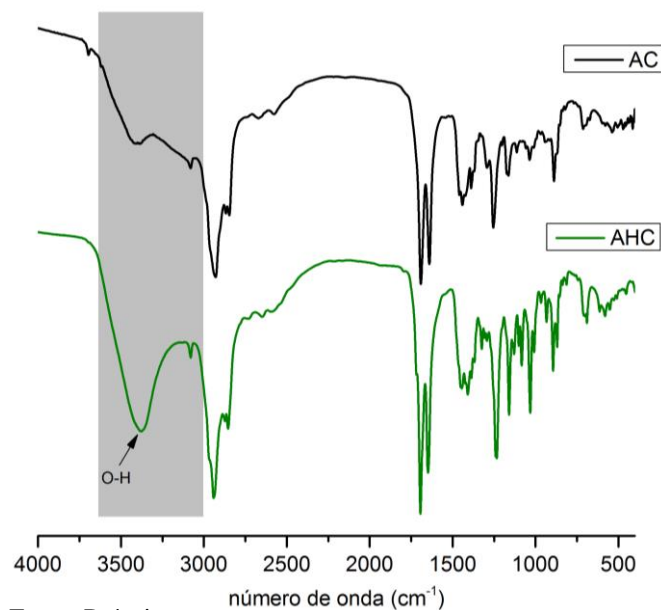
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AAC**, com destaque para H-17 e H-3.



Fonte: Própria autora.

O espectro no IV de **AHC** também apresentou bandas em comum com **AC** (Figura 20), possuindo regiões característica de grupamento ácido carboxílico, carbonilas e ligações duplas. Cabe destacar no espectro o aparecimento de uma banda intensa característica de ligação O-H em 3380 cm^{-1} , além da presença da banda larga referente a ligação O-H de ácido carboxílico ($3700\text{ a }2500\text{ cm}^{-1}$). Esses sinais permitem sugerir que além da presença do grupamento ácido carboxílico, existam também hidroxilas na molécula.

Figura 20: Espectro no infravermelho (KBr) de **AC** e **AHC**.



Fonte: Própria autora.

O espectro de RMN de ¹³C de **AHC** (Figura 21) apresentou 20 carbonos, que em comparação com HSQC-dept foram classificados em quaternários (5), metínicos (4), metilênicos (7) ou metílicos (4). Sinais característicos de diterpenos labdanos também são observados para essa substância, como a presença da dupla exocíclica [147,7 ppm (C-8) e 106,9 ppm (C-17)] e o sinal da carbonila [171,7 ppm (C-15)]. Além destes sinais, destaca-se a presença de um carbono carbinólico (78,9 ppm), atribuído a C-3.

A análise do espectro de RMN de ¹H de **AHC** (Figura 22) apontou a presença do simpleto relacionado ao sinal de hidrogênio mais deslocado [5,67 ppm (H-14)], dois simpletos largos de hidrogênios do grupo exo-metilênico [4,87 ppm (H-17b) e 4,51 ppm (H-17a)] e quatro simpletos associados a metilas [2,17 ppm (Me-16), 1,00 ppm (Me-19), 0,78 ppm (Me-18) e 0,69 ppm (Me-20)]. Um novo sinal é observado em 3,28 ppm, aparecendo como um duplo duplete atribuído a H-3 (J_{2a} e $2b = 11,5$ e $4,2$ Hz).

Figura 21: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de **AHC**.

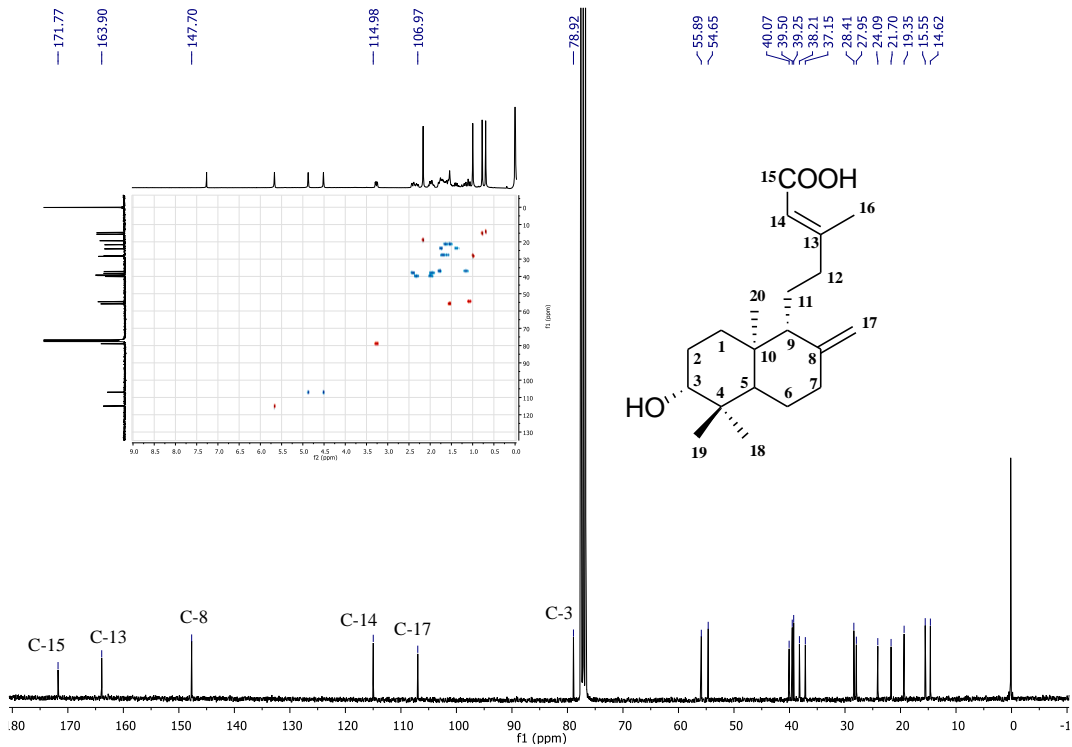
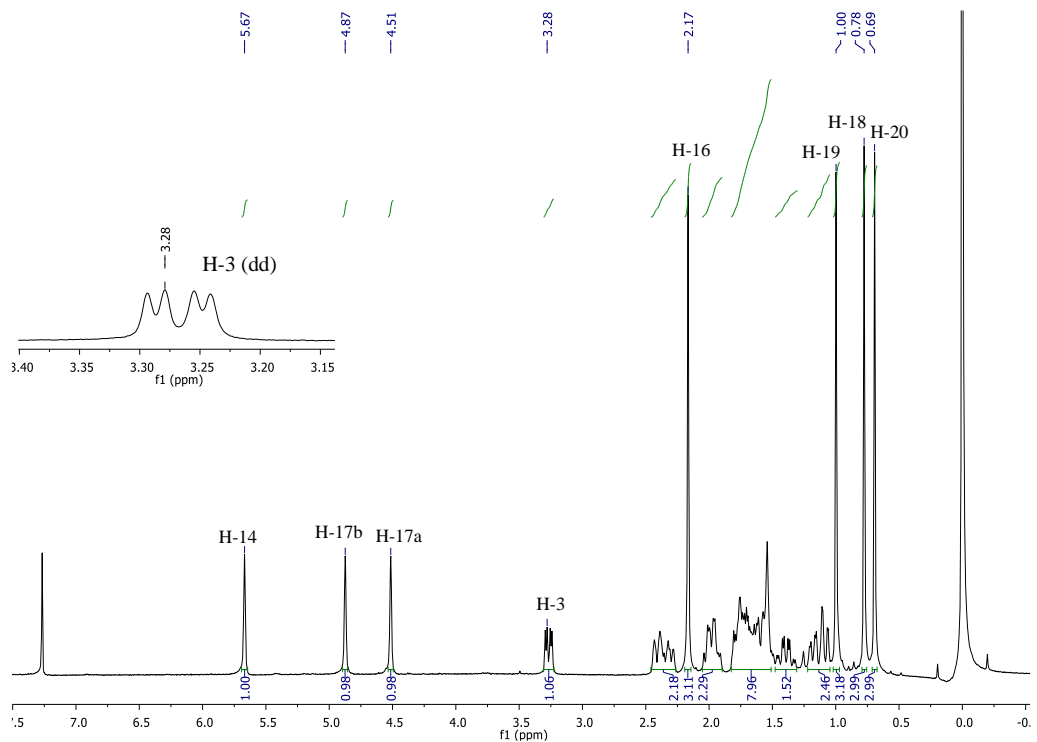
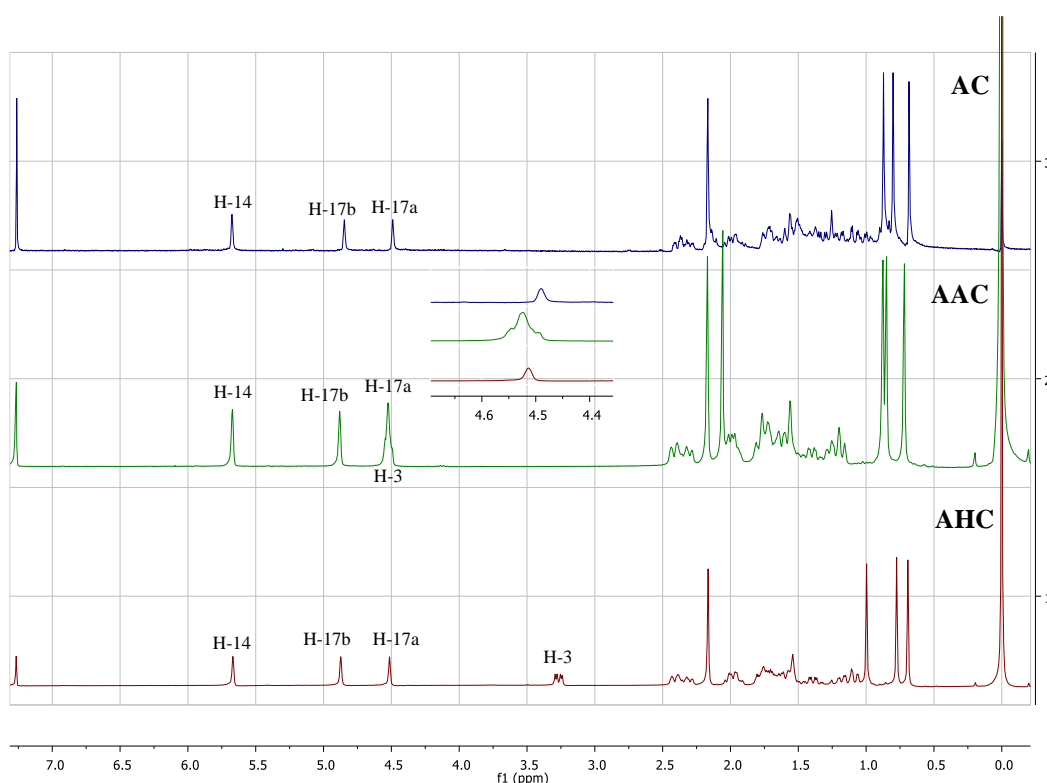


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AHC**, com destaque para H-3.



Nas figuras 23 e 24 são apresentadas comparações entre os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **AC**, **AAC** e **AHC**, destacando-se as principais diferenças. Nos espectros de RMN de ^1H de **AAC** e **AC** (Figura 23) nota-se um deslocamento do sinal de H-17a de 4,49 para 4,52 ppm, além de uma alteração no seu formato devido à sobreposição de H-3 com H-17a e a presença de um grupamento metílico a mais em relação ao **AC**. No espectro de **AHC** nota-se o aparecimento de um novo sinal em 3,28 ppm, relativo a H-3.

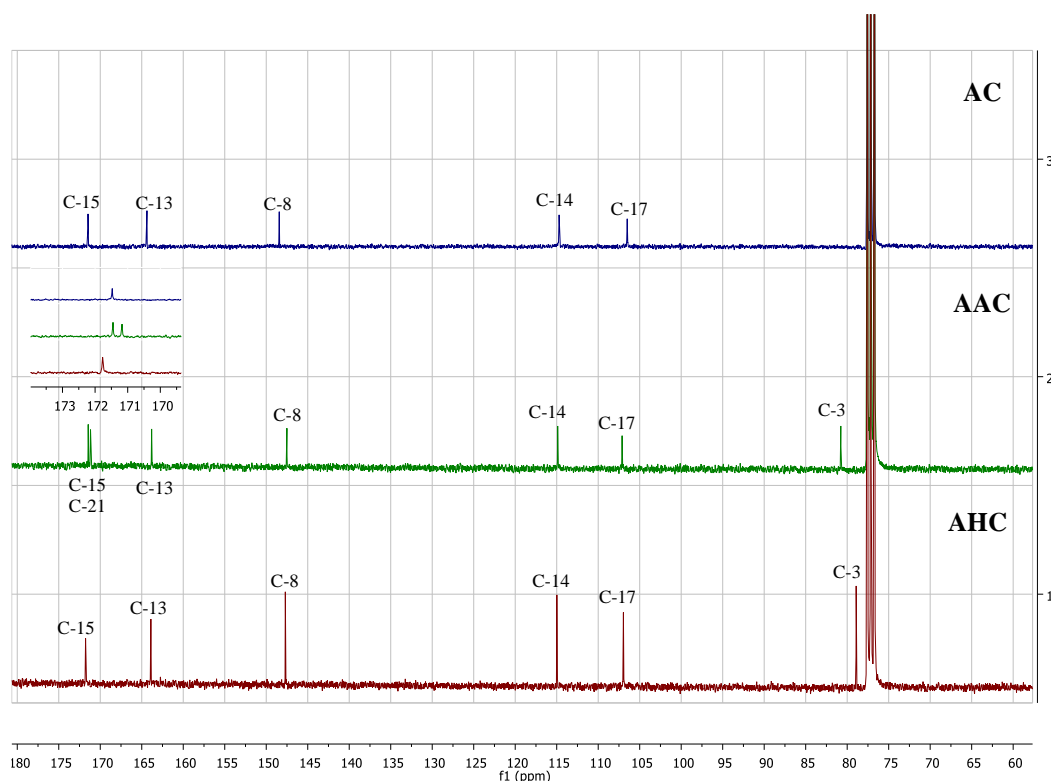
Figura 23: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AC**, **AAC** e **AHC**, com destaque para região de 4,6 – 4,4 ppm.



Fonte: Própria autora.

Na comparação dos espectros de RMN de ^{13}C de **AAC** com **AC** (Figura 24), percebe-se o aparecimento de dois sinais em regiões mais deslocadas, sendo um sinal característico de carbonila (171,1 ppm) e um sinal característico de carbono carbinólico (80,7 ppm). Já em relação ao **AHC**, nota-se o surgimento de uma sinal na região 78,9 ppm, também característico de carbono carbinólico. Por fim, a elucidação estrutural de **AAC** e **AHC** pode ser confirmada através da comparação com dados da literatura (VARGAS et al., 2015).

Figura 24: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de **AC**, **AAC** e **AHC**, com destaque para região de 173 – 170 ppm.



Fonte: Própria autora.

Através do espectro no IV de **COP1** (Figura 25) foi possível sugerir a presença do grupamento ácido carboxílico na estrutura da molécula, devido a existência de uma banda larga na região de 3300 a 2500 cm^{-1} correspondente à deformação axial de O-H e uma banda referente a deformação axial de C=O em 1694 cm^{-1} . Pode-se sugerir também a presença de instauração na molécula devido a banda característica de ligação dupla em 1642 cm^{-1} . Nesse espectro percebe-se ainda a presença de uma segunda carbonila na região de 1717 cm^{-1} , quando comparado ao **AC**, podendo-se sugerir a presença de uma cetona na estrutura de **COP1**.

O espectro de RMN de ^{13}C de **COP1** (Figura 26) mostrou a presença de 18 carbonos, ou seja, dois carbonos a menos que o **AC**. Através de comparação com o espectro de HSQC-dept os carbonos puderam ser definidos como quaternários (5), metínicos (2), metilênicos (8) ou metílicos (3). Destaca-se a presença de dois carbonos carbonílicos [209,5 ppm (C-13) e 182,9 ppm (C-16)] e de dois carbonos insaturados, correspondentes à dupla exocíclica [147,8 ppm (C-8) e 106,7 ppm (C-15)], típica de diterpenos do tipo labdano presentes em espécies de *Copaifera*. A análise permite notar a presença de uma segunda carbonila, quando comparado

ao **AC**, com deslocamento químico em uma região mais deslocada do espectro, característico de cetona, além da ausência do sistema olefínico da cadeia lateral.

Figura 25: Espectro no infravermelho (KBr) de **AC** e **COP1**.

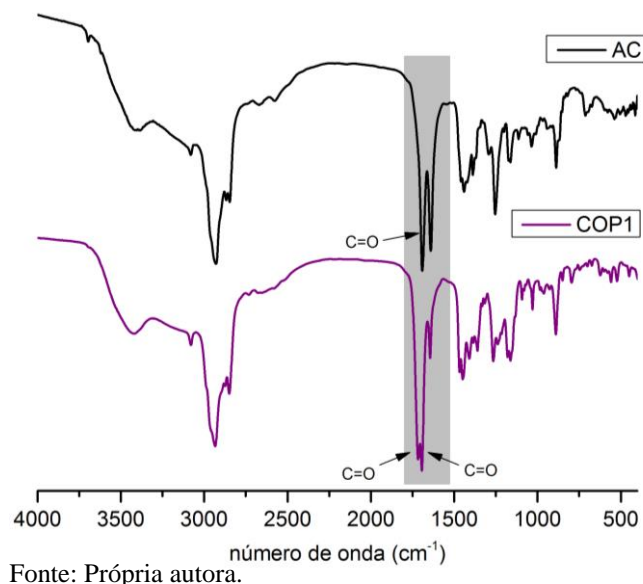
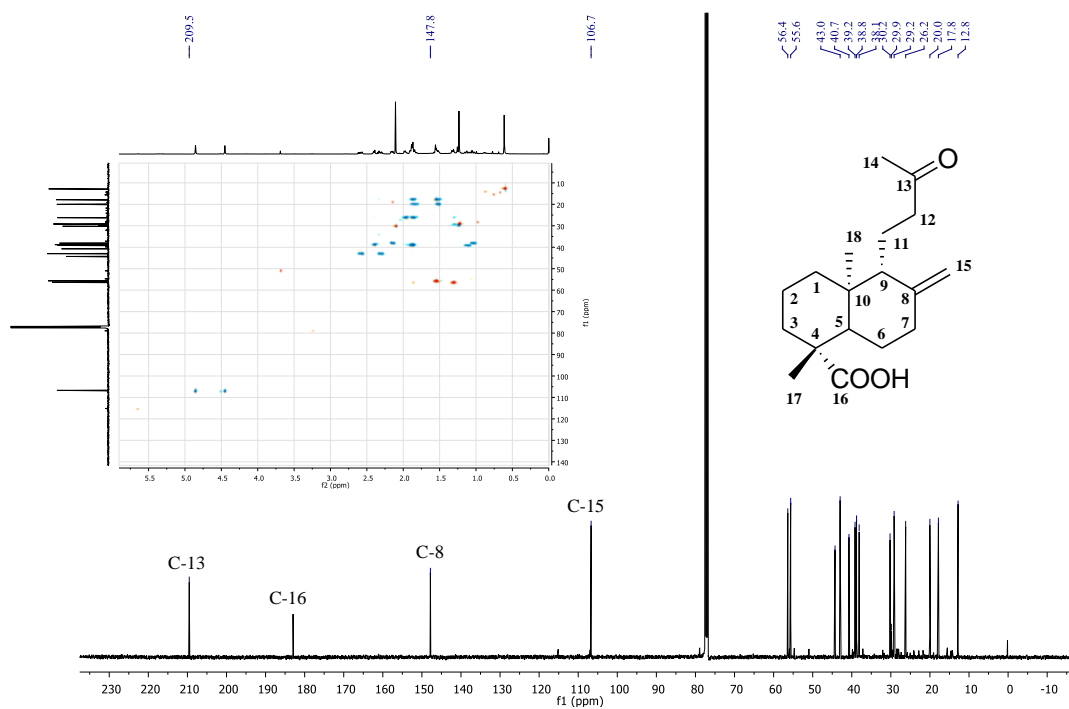
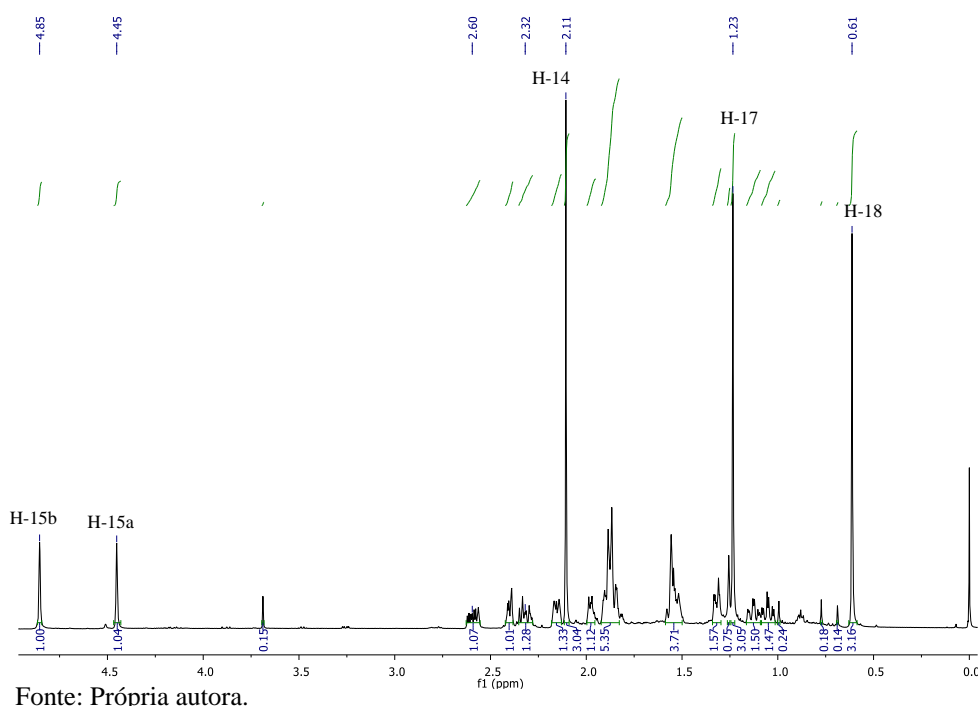


Figura 26: Espectros de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), HSQC-dept e estrutura molecular de **COP1**.



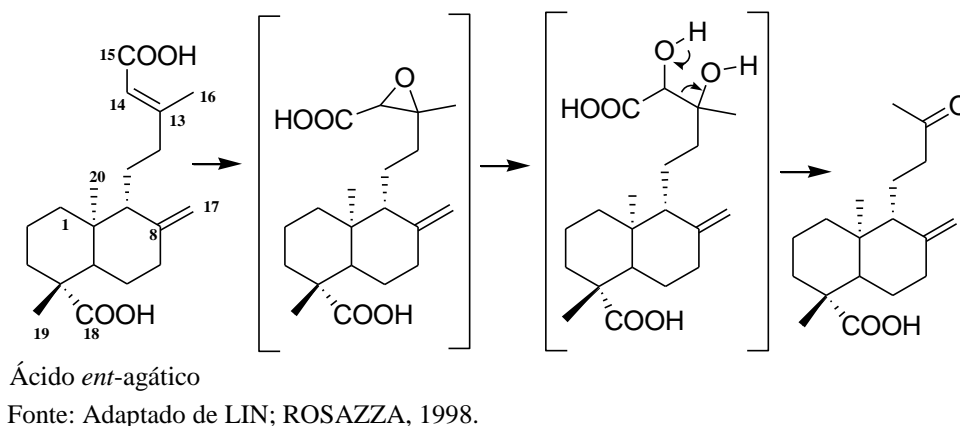
O espectro de RMN de ^1H de **COP1** (Figura 27) apresentou três simpletos correspondentes a metilas [2,11 ppm (H-14), 1,23 ppm (Me-17) e 0,61 ppm (Me-18)] e dois simpletos largos relacionados com os hidrogênios do grupo exo-metilênico [4,85 ppm (H-15b) e 4,45 (H-15a)]. Nota-se a presença de um grupamento metílico a menos que o observado no espectro de RMN de ^1H de **AC**, além do desaparecimento do sinal mais deslocado em 5,67 ppm (H-14), confirmando a ausência da instauração na cadeia lateral.

Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **COP1**.



A cadeia lateral de **COP1** se diferencia dos demais diterpenos aqui descritos pela ausência do grupamento ácido, que aparece ligado a C-16. Sugere-se que sua formação seja em decorrência de uma clivagem oxidativa na cadeia lateral de um diterpeno labdano, como por exemplo o ácido *ent*-agático, envolvendo possivelmente uma epoxidação inicial da olefina em C-13 e C-14, com posterior abertura do epóxido, formando o metabólito dinor-labdano (Esquema 1) (LIN; ROSAZZA, 1998).

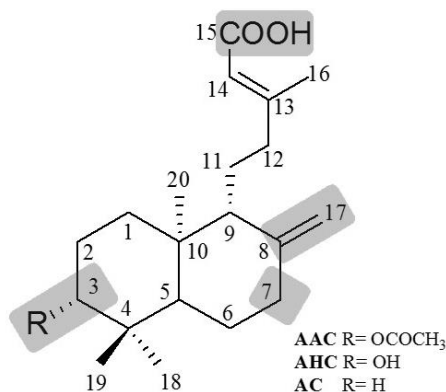
A comparação com dados da literatura (POPOVA et al., 2009) permitiu identificar **COP1** como *ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico*. A substância já foi descrita para espécies dos gêneros *Thuja*, *Platycladus* e *Cupressus* (INOUE; HASEGAWA; HIROSE, 1985; KIM et al., 2013; KIM; CHOI; LEE, 2012; LIU; ZHOU; ZHANG, 2010; TANAKA et al., 2000), todas pertencentes à família Cupressaceae, sendo descrita pela primeira vez para uma espécie da família Leguminosae.

Esquema 1: Proposta de biossíntese de **COP1** em *C. langsdorffii*.

4.3.SEMISSÍNTESE DE DITERPENOS ÁCIDOS DO TIPO LABDANO

4.3.1. Considerações iniciais

Pretendeu-se realizar a síntese de uma biblioteca de derivados de ácido copálico (**AC**), ácido 3-acetoxi-copálico (**AAC**) e ácido 3-hidroxi-copálico (**AHC**), na busca por protótipos candidatos a fármacos anti-inflamatórios, anticancerígenos e antibacterianos em vista da promissora atividade biológica apresentada pelos precursores. Para a obtenção dos análogos foram aplicadas estratégias consolidadas em Química Medicinal, como variação e adição de grupos funcionais (WERMUTH et al., 2015), envolvendo as posições 3, 7, 15 e 17 do esqueleto diterpênico (Figura 28).

Figura 28: Regiões dos diterpenos labdanos que sofreram modificações estruturais.

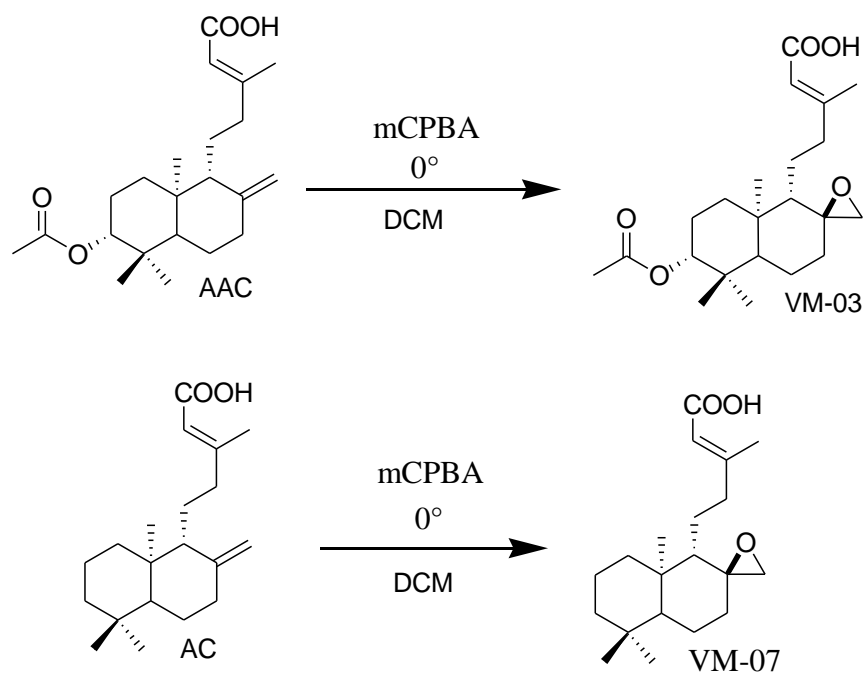
Fonte: Própria autora.

4.3.2. Epoxidação

Em uma molécula ativa, a alteração da configuração relativa dos grupamentos farmacofóricos pode repercutir diretamente no seu reconhecimento pelo biorreceptor, implicando em perda da complementariedade e, conseqüentemente, o seu perfil biológico (BARREIRO; FRAGA, 2015; WERMUTH et al., 2015). A influência do sistema exometilênico entre C-8 e C-17 para a atividade biológica dos diterpenos labdanos encontrados em espécie de *Copaifera* foi inicialmente estudada através de sua conversão a epóxido. Em um estudo desenvolvido por Matos et al. (2015) observou-se um aumento da atividade biológica do análogo epoxidado de ácido copálico contra *Micobacterium tuberculosis*, sugerindo uma baixa contribuição do sistema exo-metilênico contra o alvo avaliado (MATOS et al., 2015).

A metodologia empregada nesse trabalho seguiu àquela adotada por Matos et al. (2015). Assim a reação de epoxidação foi realizada utilizando mCPBA e os produtos de partida foram AAC, para obtenção de VM-03 e AC, para obtenção de VM-07 (Esquema 2), com rendimentos de 74,5% e 75,4%, respectivamente.

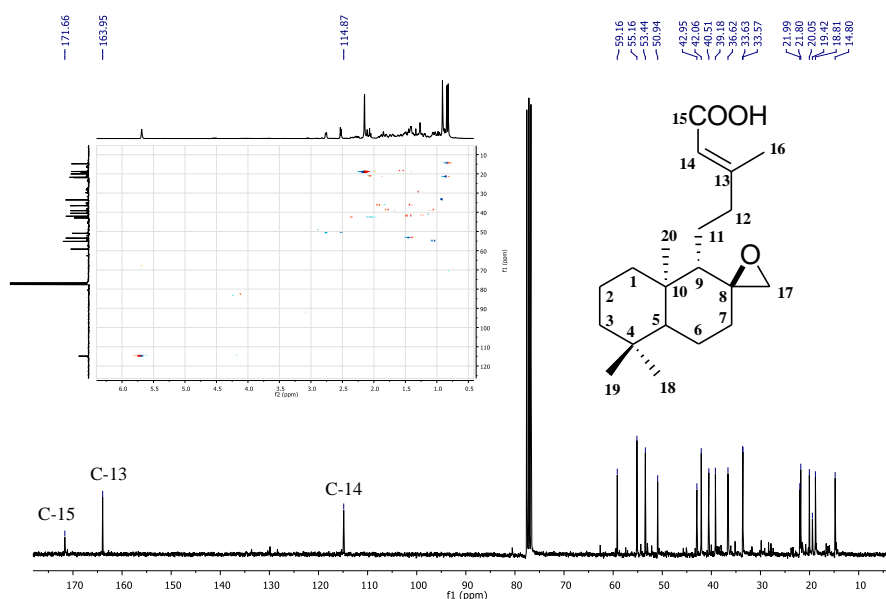
Esquema 2: Epoxidação de AAC e AC.



Fonte: Própria autora.

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C e de HSQC-dept de **VM-07** (Figura 29) mostrou a presença de 20 carbonos e permitiu identificar a formação do epóxido devido ao desaparecimento dos sinais dos carbonos C-8 e C-17, pertencentes à dupla exocíclica, e ao surgimento dos sinais em 59,1 ppm e 50,9 ppm atribuídos a C-8 e C-17, respectivamente, com o auxílio do espectro HMBC.

Figura 29: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de **VM-07**.



A formação do epóxido também pode ser confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H de **VM-07** (Figura 30), onde foi possível observar o desaparecimento dos hidrogênios do sistema exo-metilênico e a presença de um duplo duplete em 2,75 ppm (J_{17a} e $17b = 4,3$ e $1,7$ Hz) e de um duplete em 2,52 ppm ($J_{17b} = 4,3$ Hz), ambos referentes aos hidrogênios de C-17. Por fim a estrutura de **VM-07** foi confirmada por comparação com dados da literatura (MATOS et al., 2015).

VM-03 foi elucidado pela análise de espectros no IV (Figura 31), RMN de ^1H (Figura 32) e por comparação com **VM-07** e com seu precursor, **AAC** (Figura 33). No espectro de IV de **VM-03** nota-se a presença de uma segunda banda característica de ligação C-O em 1251 cm^{-1} , podendo ser atribuída a presença do epóxido.

Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-07**, com destaque para os sinais referentes a H-17.

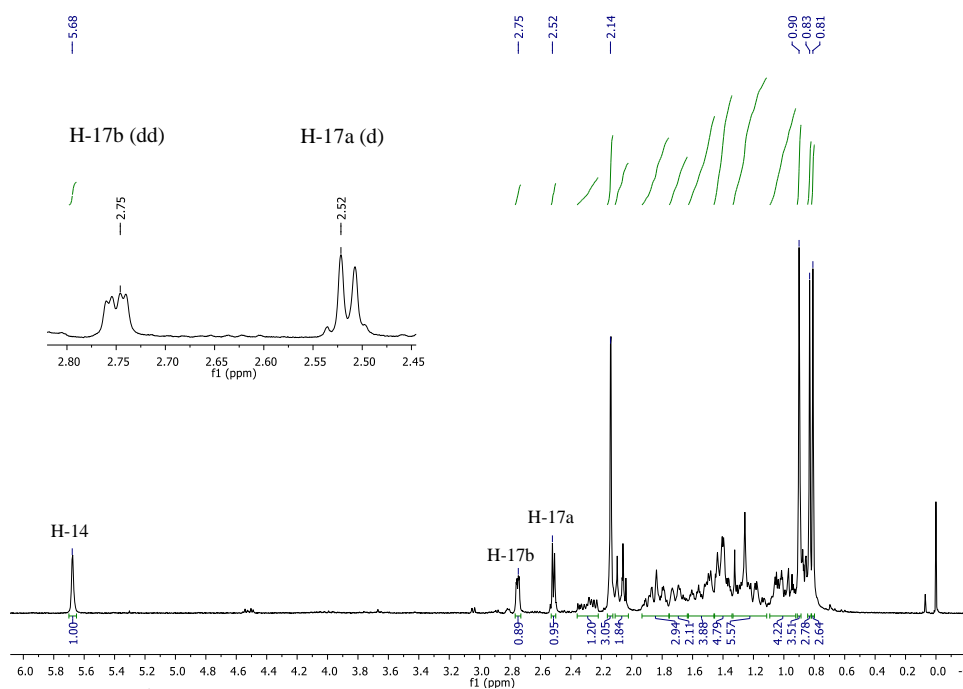
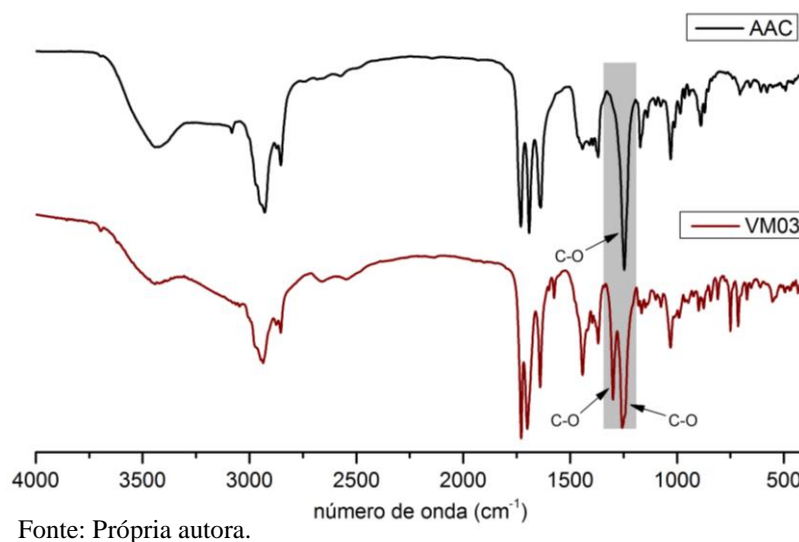
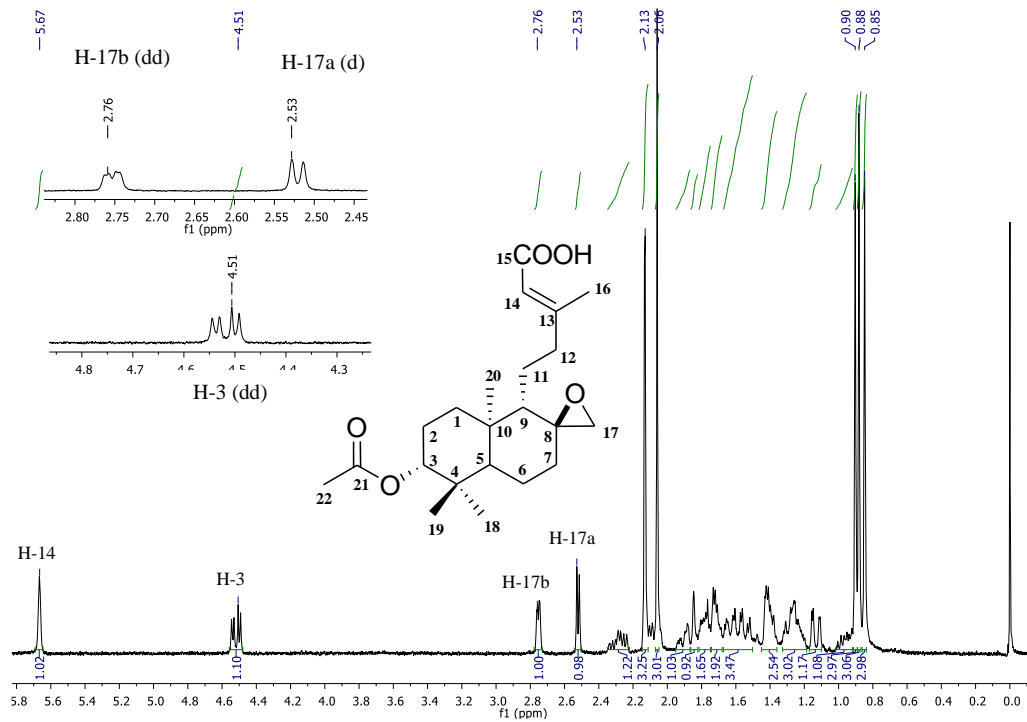


Figura 31: Espectro no infravermelho (KBr) de AAC e VM-03.



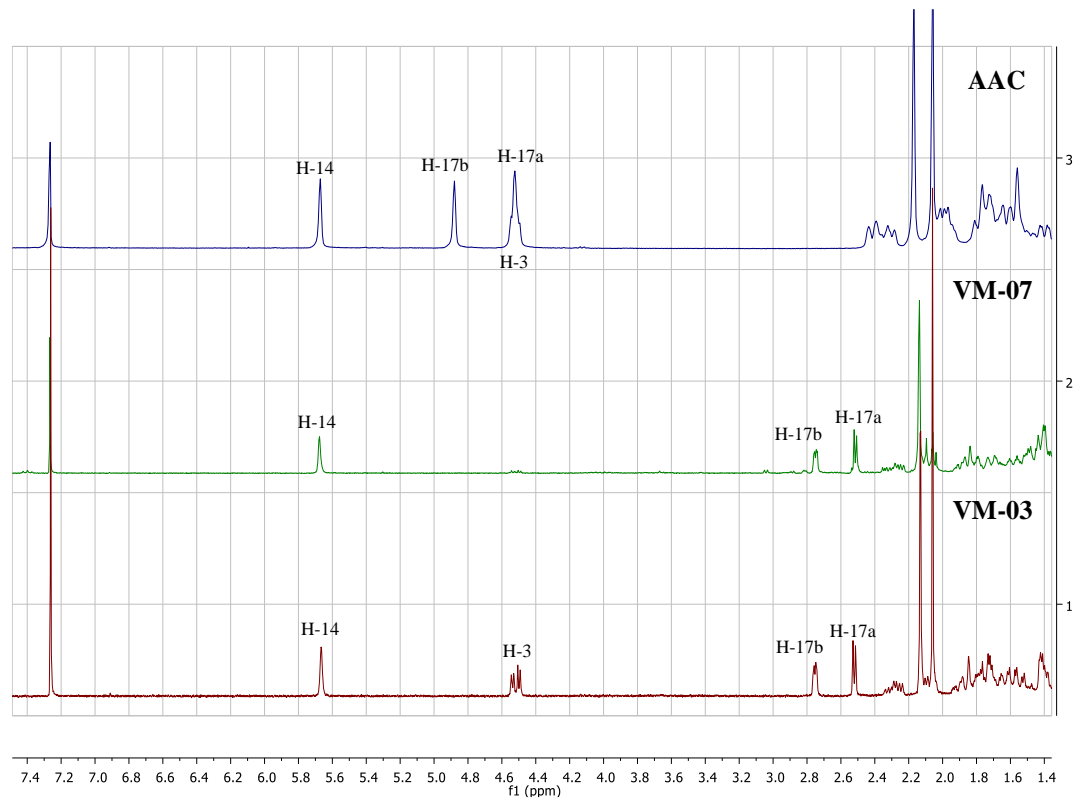
Pela análise do espectros de RMN de ^1H (Figura 32) foi possível observar o desaparecimento dos sinais referentes aos hidrogênios da dupla exo-cíclica (H-17) e o surgimento dos sinais correspondentes à formação do epóxido em 2,76 ppm (dd, $J_{17a} = 4,3$ e 1,4 Hz) e 2,53 ppm (d, $J_{17b} = 4,3$ Hz), de maneira semelhante ao observado em **VM-07** (Figura 33).

Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **VM-03**, com destaque para H-17 e H-3.



Fonte: Própria autora.

Figura 33: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AAC, VM-07 e VM-03.



Fonte: Própria autora.

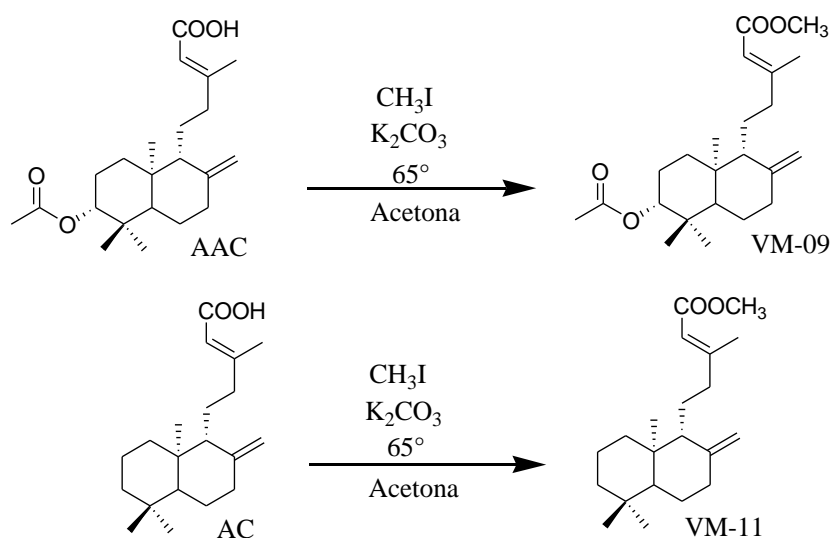
4.3.3. Esterificação do ácido carboxílico

A esterificação de ácidos carboxílicos pode ser realizada com diferentes objetivos, considerando que podem acarretar em mudanças na solubilidade, na conformação molecular e na configuração eletrônica. Ademais, uma função reativa, como o hidrogênio ativo pertencente à uma hidroxila, pode ser mascarada, reduzindo sua reatividade (WERMUTH et al., 2015). Um bom grupo protetor deve reagir seletivamente, com bom rendimento e gerando substratos que sejam estáveis às reações planejadas, além de formar derivados que possam ser facilmente separados dos produtos secundários associados à sua formação ou clivagem (WUTS; GREENE, 2007).

Visando a proteção do ácido carboxílico da cadeia lateral para posterior oxidação alílica de C-7, foi realizada a esterificação utilizando iodometano. Além da proteção, essa modificação permite avaliar a importância do ácido carboxílico para a atividade biológica de diterpenos labdanos. Alguns estudos já observaram redução drástica da atividade antibacteriana do copalato de metila em comparação ao ácido copálico (ABRÃO et al., 2015; SOUZA et al., 2011a).

Os ésteres metílicos de AAC e AC foram obtidos pela reação com CH_3I na presença de K_2CO_3 , em acetona, para obtenção de VM-09 (95,4%) e VM-11 (71,2%), respectivamente (Esquema 3).

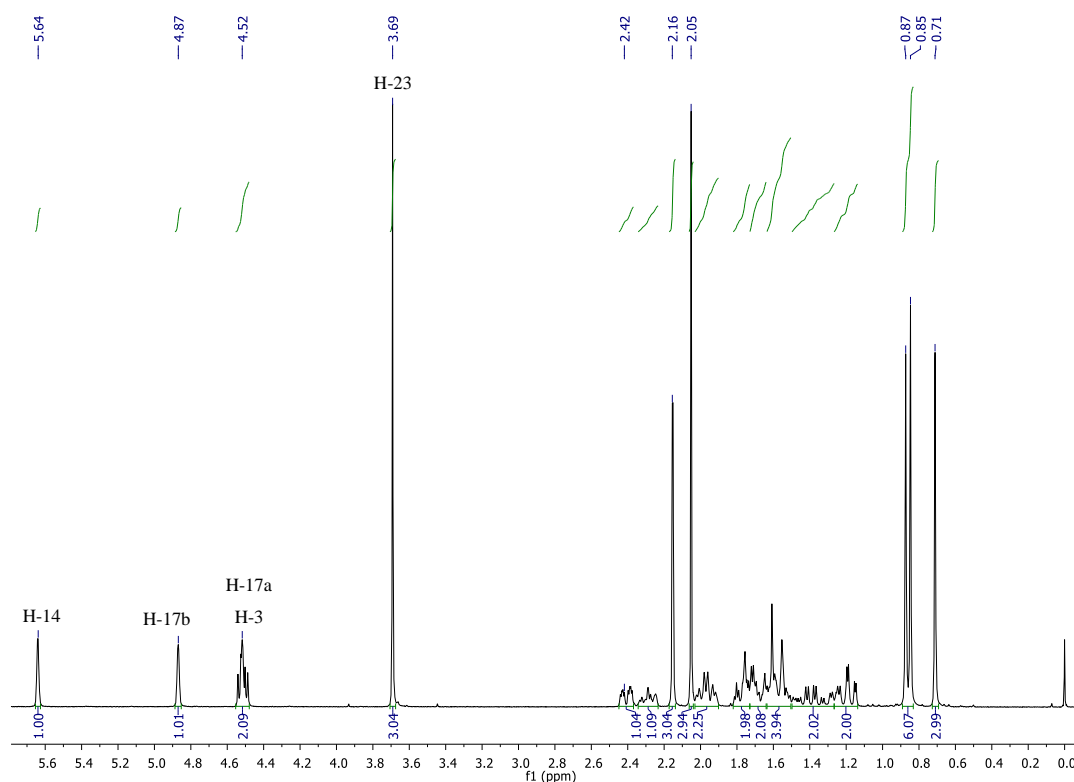
Esquema 3: Esterificação do ácido carboxílico de AAC e AC.



Fonte: Própria autora.

Por intermédio do espectro de RMN de ^1H de **VM-09** (Figura 34) foi possível confirmar a esterificação do ácido carboxílico devido ao aparecimento de um simpleto deslocado (3,69 ppm, Me-23), característico de ésteres metílicos.

Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-09**.



Fonte: Própria autora.

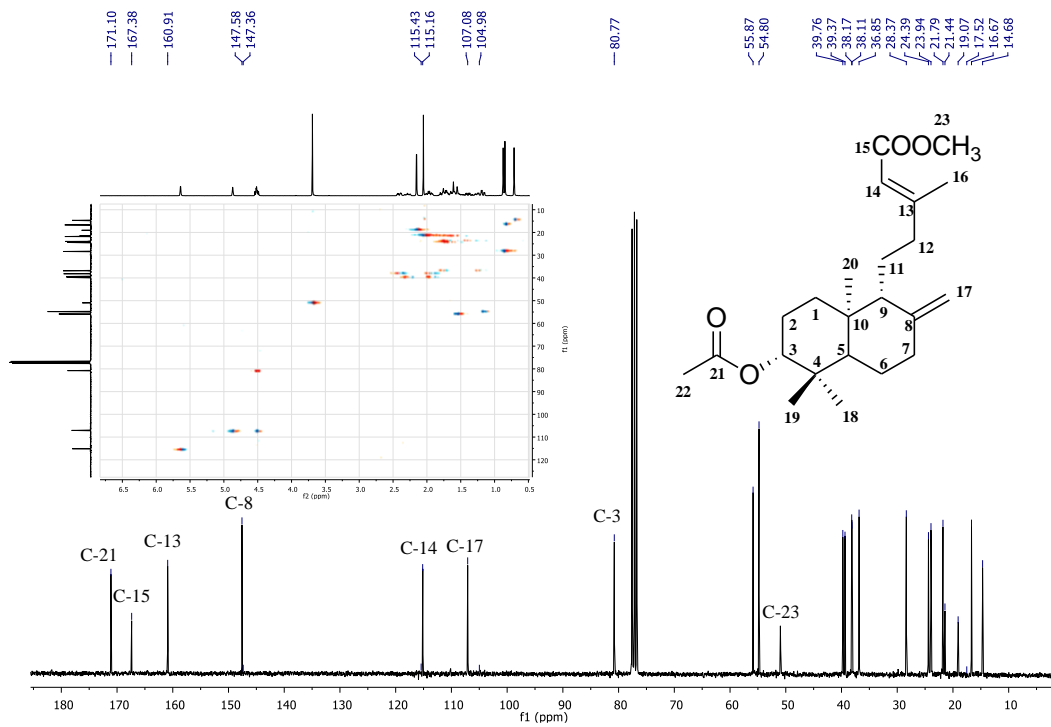
O incremento de um carbono, quando comparado à **AAC**, foi observado no espectro de RMN de ^{13}C e de HSQC-dept de **VM-09** (Figura 35), totalizando 23 carbonos. Através de análise do espectro de HMBC foi possível identificar o novo carbono metílico em 50,9 ppm, correspondente ao C-23.

Em relação à substância **VM-11**, ao se analisar o espectro no IV (Figura 36) pode-se sugerir a formação do éster metílico na cadeia lateral devido a presença de uma deformação axial $\text{C}=\text{O}$ em 1722 cm^{-1} e dois estiramentos referentes a $\text{C}-\text{O}$ em 1225 e 1148 cm^{-1} , característicos de éster. Ainda, ao se comparar o espectro de **VM-11** com o espectro de seu precursor (**AC**), percebe-se a ausência da banda larga de $\text{O}-\text{H}$, o que permite sugerir a perda do grupamento ácido.

Na elucidação de **VM-11**, a análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37) mostrou a presença de 21 carbonos, sendo um carbono a mais que a estrutura do produto de partida, **AC**.

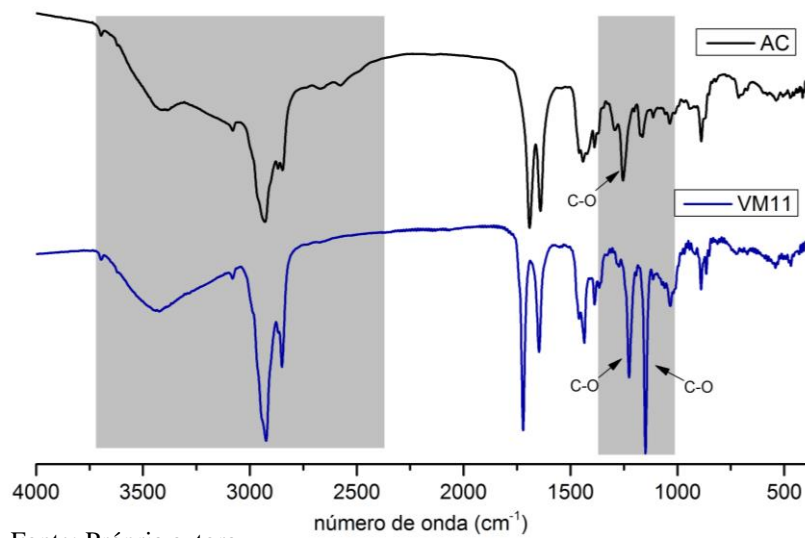
A presença de um novo carbono em 50,9 ppm é o mesmo observado em **VM-09**, permitindo atribuir esse deslocamento ao C-21.

Figura 35: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de **VM-09**.



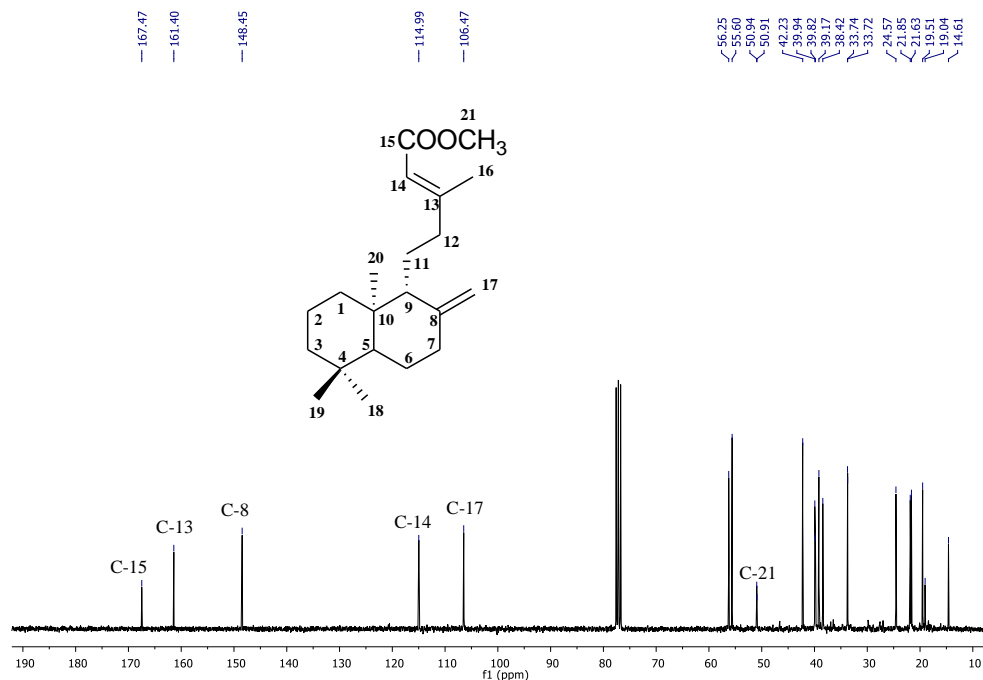
Fonte: Própria autora.

Figura 36: Espectro no infravermelho (KBr) de **AAC** e **VM-11**.



Fonte: Própria autora.

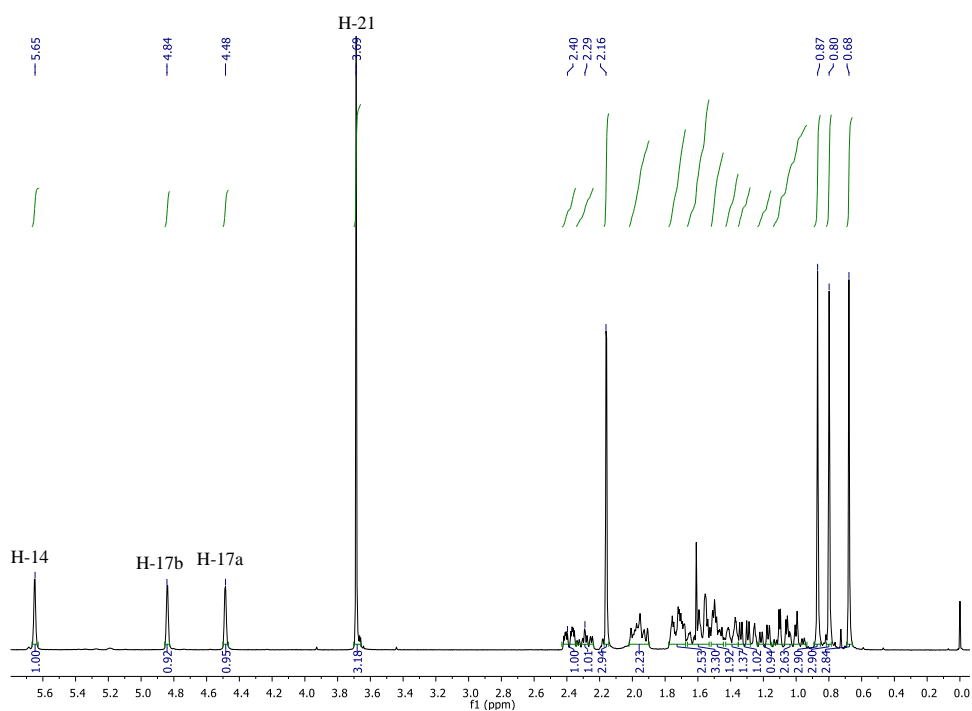
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **VM-11**.



Fonte: Própria autora.

No espectro de RMN de ^1H de **VM-11** (Figura 38) é possível perceber a presença de um novo simpleto em 3,69 ppm, referente aos hidrogênios do grupamento metil inserido (Me-21), confirmando a esterificação de **AC**.

Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-11**.

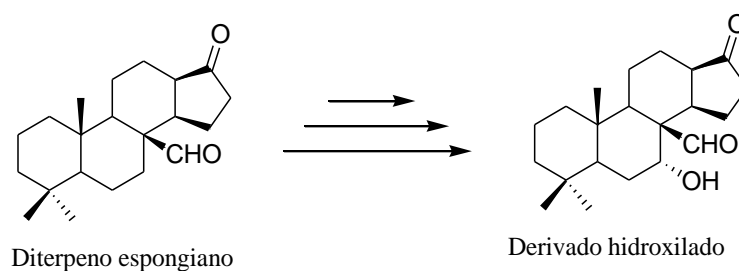


Fonte: Própria autora.

4.3.4. Oxidação

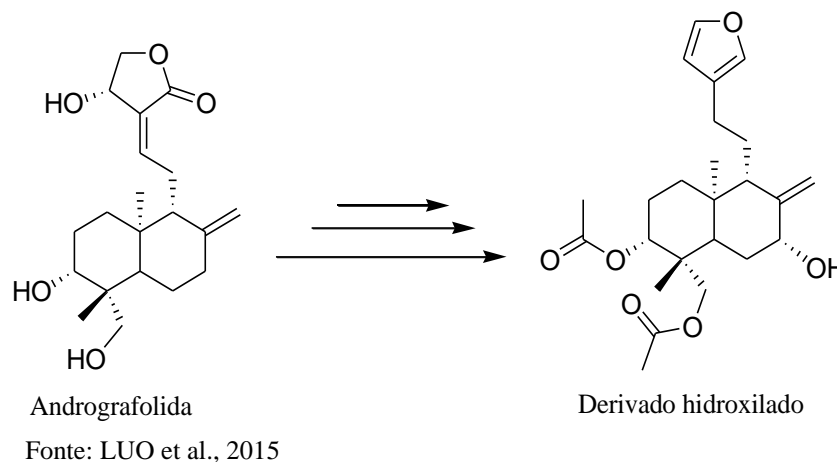
A substituição de um átomo de hidrogênio por um novo átomo ou grupo funcional pode acarretar em alterações de parâmetros moleculares como densidade eletrônica, coeficiente de partição e estereoquímica relativa, que podem afetar tanto a fase farmacocinética quanto a farmacodinâmica de uma substância ativa. Essas perturbações podem interferir diretamente na potência, duração e até mesmo na natureza do efeito farmacológico (WERMUTH et al., 2015). A inserção de uma hidroxila, por exemplo, pode tornar uma substância ativa mais solúvel em água, devido a alteração do coeficiente de partição e ainda propiciar uma maior e melhor interação com o biorreceptor devido à presença de novos grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio (WERMUTH et al., 2015). Assim, a inserção de uma hidroxila através de uma reação de oxidação pode acarretar em profundas alterações na atividade biológica, como observado para o derivado de diterpeno espongiário oxigenado em C-7 (Figura 39). Esse derivado obtido por síntese empregando o reagente *m*-CPA, mostrou redução da atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais HeLa (carcinoma cervical humano) e HEP-2 (carcinoma da laringe humana) (ARNÓ et al., 2003).

Figura 39: Diterpeno espongiário e derivado hidroxilado.

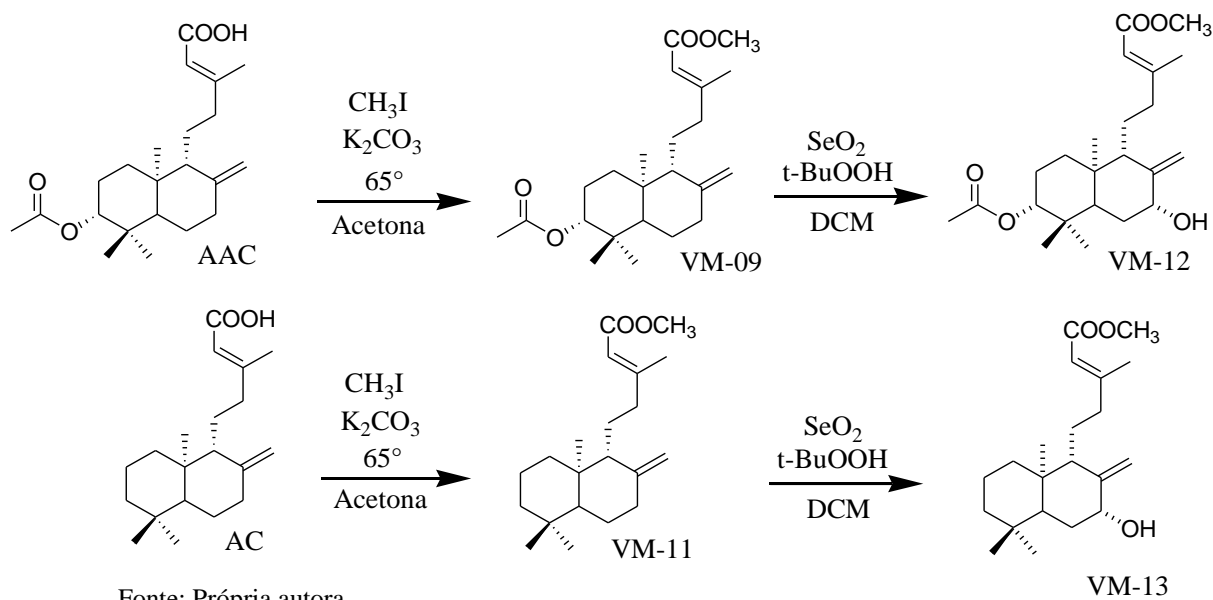


Fonte: ARNÓ et al., 2003

Já no trabalho de Luo et al. (2015), um derivado do diterpeno labdano andrografolida hidroxilado em C-7, obtido por via semissintética utilizando os reagentes $\text{SeO}_2/\text{t-BuOOH}$ (Figura 40), apresentou atividade citotóxica superior frente a células de carcinoma de bexiga humana NTUB1, sendo considerada benéfica a inserção de uma hidroxila nessa região.

Figura 40: Diterpeno labdano andrografolida e derivado hidroxilado.

Até o momento não se tem conhecimento de derivados de ácido copálico e ácido 3-acetóxi-copálico hidroxilados em C-7. Nesse sentido, procurou-se obter análogos através de reações de oxidação alílica à dupla exocíclica. Para tanto, os intermediários **VM-09** e **VM-11** foram submetidos a reação com SeO_2 / $t\text{-BuOOH}$ para obtenção de **VM-12** (57,5%) e **VM-13** (54,0%), respectivamente (Esquema 4).

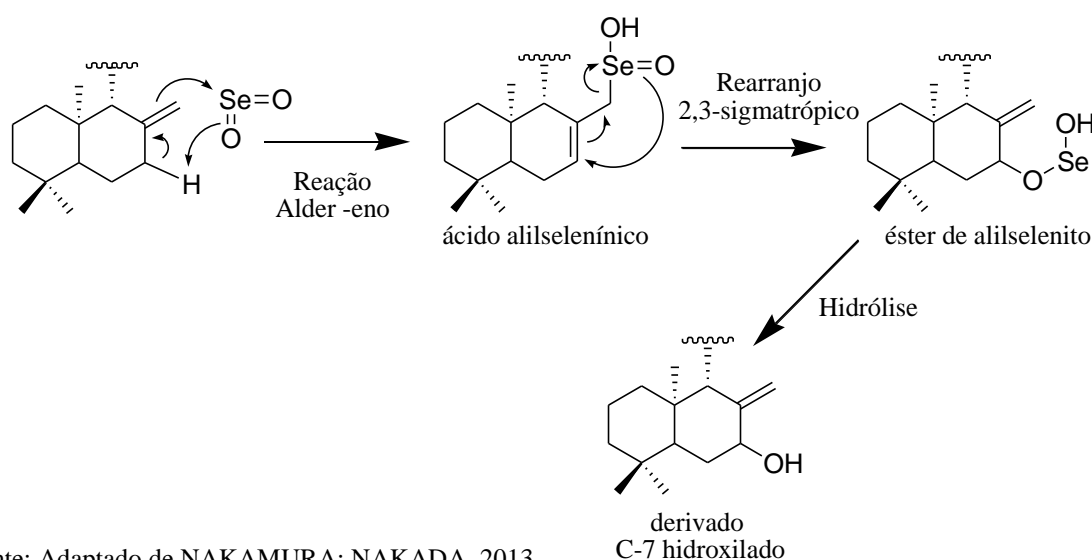
Esquema 4: Oxidação de AAC e AC.

Dióxido de selênio (SeO_2) é o reagente de selênio mais comumente empregado em oxidações alílicas, principalmente devido à quimiosseletividade quando comparado aos

reagentes de cromo. Na maioria dos casos observa-se a formação de um álcool alílico, tornando-o o reagente de primeira escolha nesse tipo de reação (NAKAMURA; NAKADA, 2013).

A reação de olefinas com dióxido de selênio é composta basicamente por três etapas, iniciando com uma reação Alder-eno, seguida de um rearranjo 2,3-sigmatrópico e finalizada com uma hidrólise, formando assim o álcool alílico (Esquema 5) (NAKAMURA; NAKADA, 2013; STEPHENSON; SPETH, 1979).

Esquema 5: Mecanismo proposto para oxidação alílica de **VM-09** e **VM-11**.

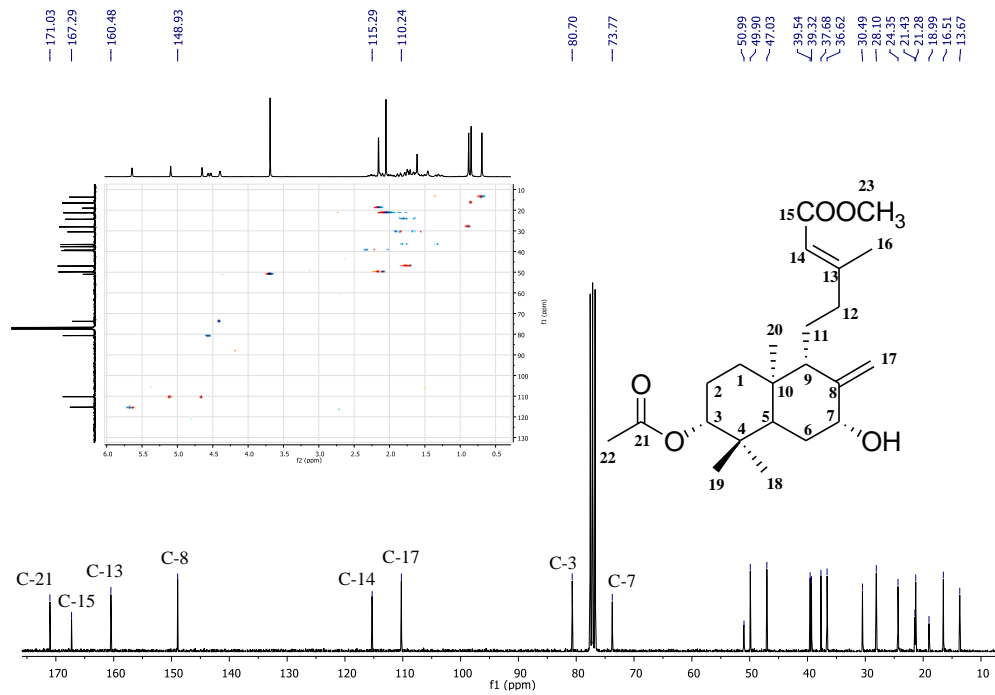


Fonte: Adaptado de NAKAMURA; NAKADA, 2013.

Por meio dos espectros de RMN de ^{13}C e de HSQC-dept de **VM-12** (Figura 41) foi possível identificar o sucesso da oxidação alílica devido ao aparecimento de um novo carbono carbinólico em 73,7 ppm. Através de espectros de HMBC foi possível confirmar que o novo carbono corresponde a C-7.

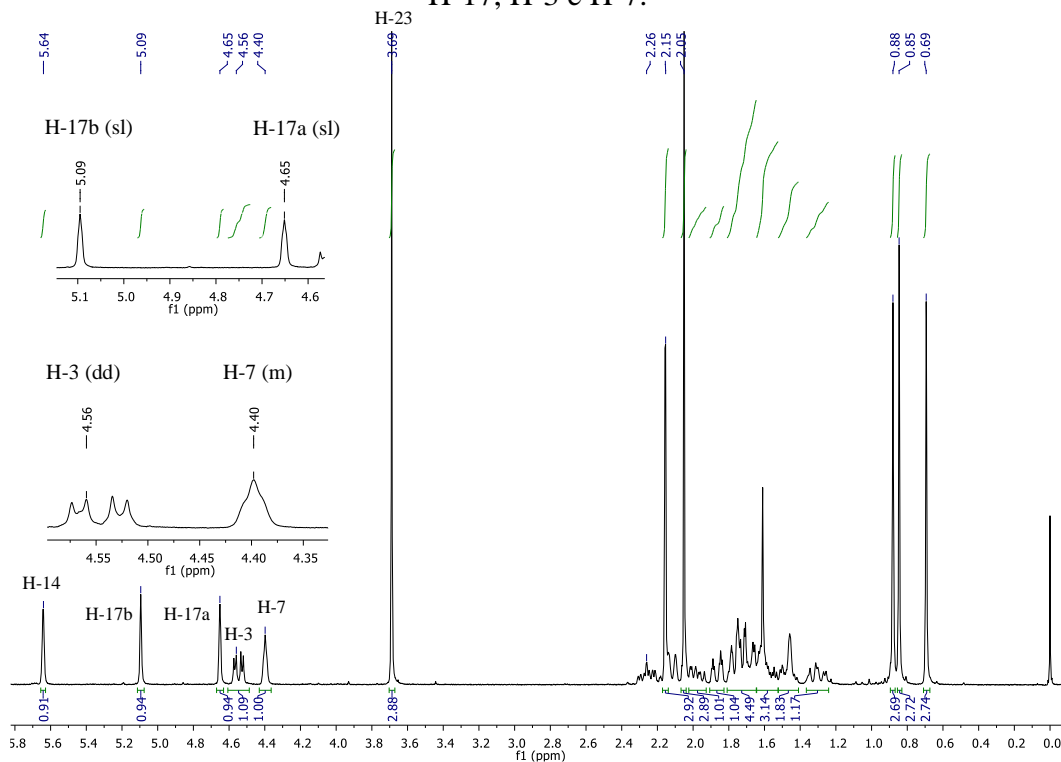
Pelo espectro de RMN de ^1H de **VM-12** (Figura 42) pode-se observar a alteração dos valores de deslocamento de H-17 devido à mudança do ambiente químico. No espectro não há mais a sobreposição dos deslocamentos de H-17a e H-3 (em 4,51 ppm), como observado em **VM-09** e **AAC** (Figura 43). Agora, percebe-se claramente a presença de um duplo duplete em 4,56 ppm ($J_{2a \text{ e } b} = 11, 8 \text{ e } 4,3 \text{ Hz}$, H-3) e dois simpletos largos em δ 5,09 e 4,65 ppm (H-17). Além disso, um novo multiplete aparece em 4,40 ppm, referente à H-7, agora hidroxilado.

Figura 41: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de HSQC-dept e estrutura molecular de VM-12.



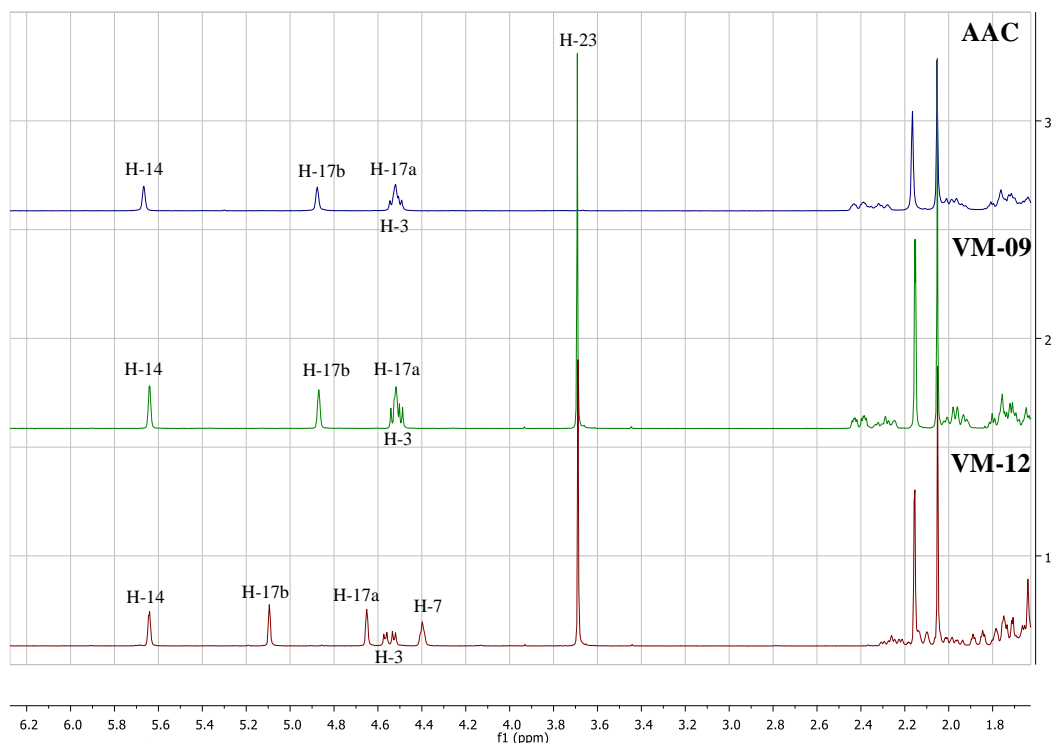
Fonte: Própria autora.

Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de VM-12, com destaque para H-17, H-3 e H-7.



Fonte: Própria autora.

Figura 43: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AAC**, **VM-09** e **VM-12**.



A análise do espectro de RMN de ^1H de **VM-13** (Figura 44) mostrou a presença de dois simpletos largos em 5,07 e 4,63 ppm, correspondentes aos hidrogênios H-17, que aparecem mais deslocados que os dos precursores **AC** e **VM-11**, porém próximos aos valores observados em **VM-12**. Nesse espectro nota-se também o aparecimento de um multipletto em 4,38 ppm, referente ao H-7.

O espectro de RMN de ^{13}C de **VM-13** (Figura 45) mostrou o aparecimento de um novo carbono terciário com deslocamento característico de carbono carbinólico (74,1 ppm), confirmando a hidroxilação de C-7.

Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-13**.

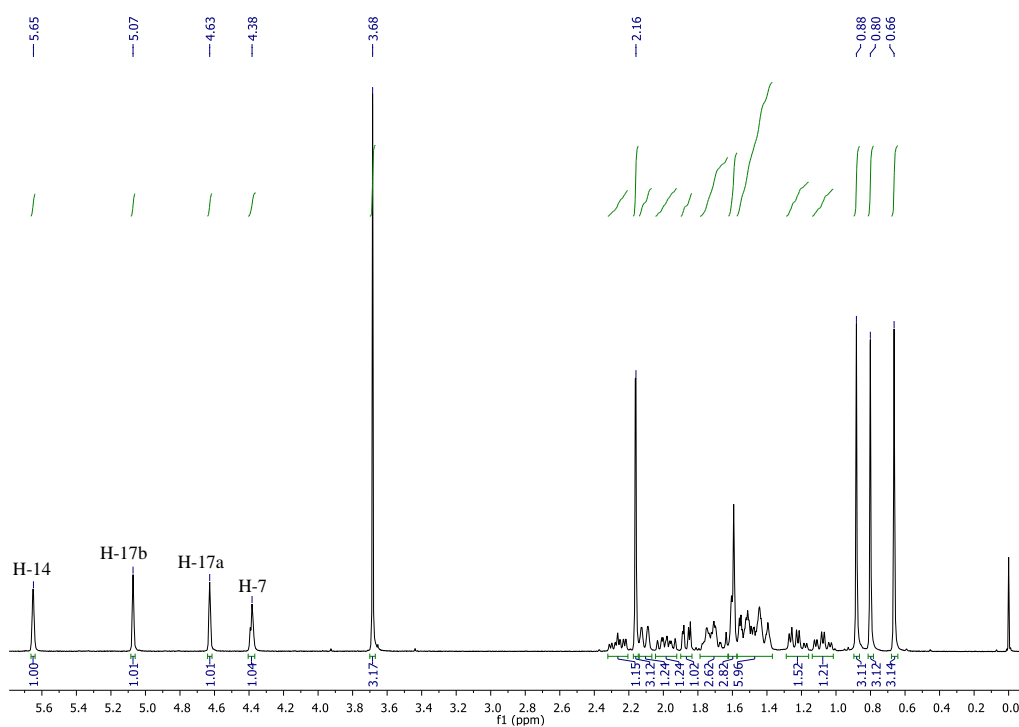
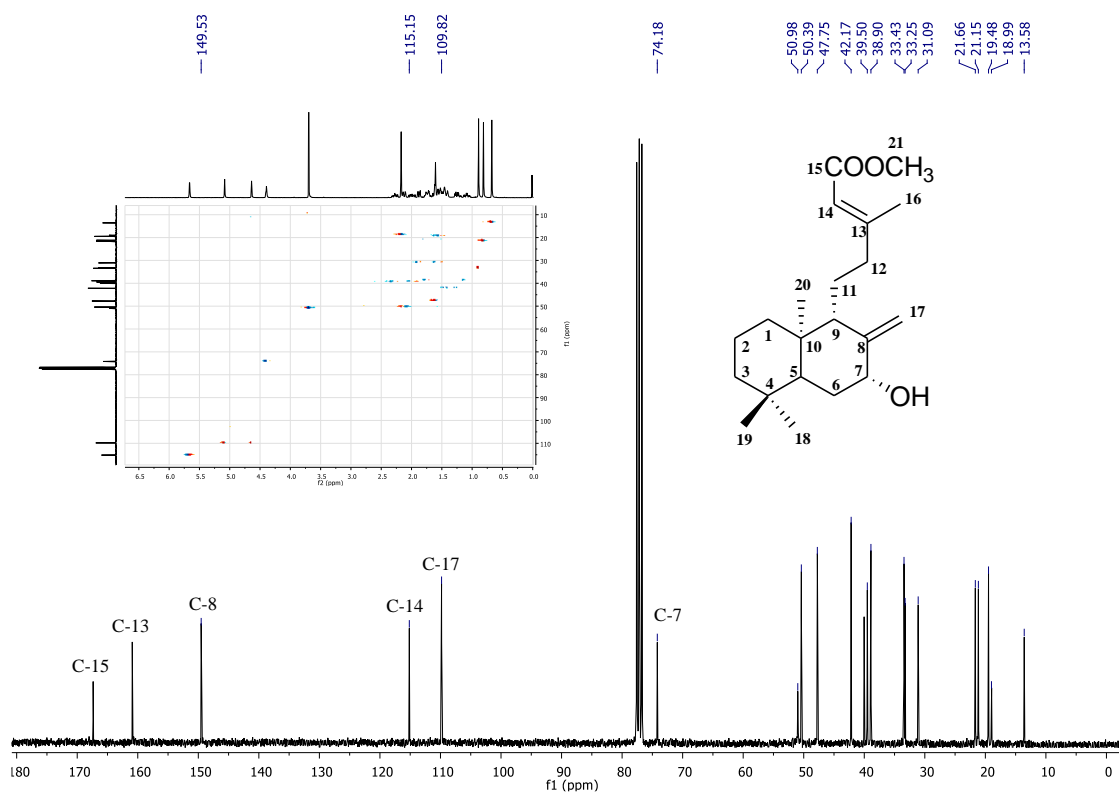
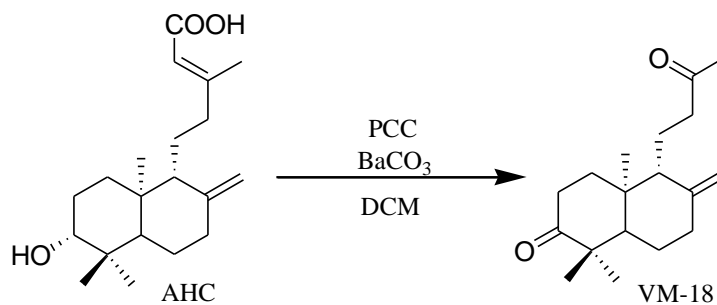


Figura 45: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de **VM-13**.



A substância **AHC** foi submetida à reação com PCC (Esquema 6) com objetivo de avaliar a relevância da hidroxila para a atividade biológica. O rendimento alcançado foi de 46,3%.

Esquema 6: Oxidação do ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**).



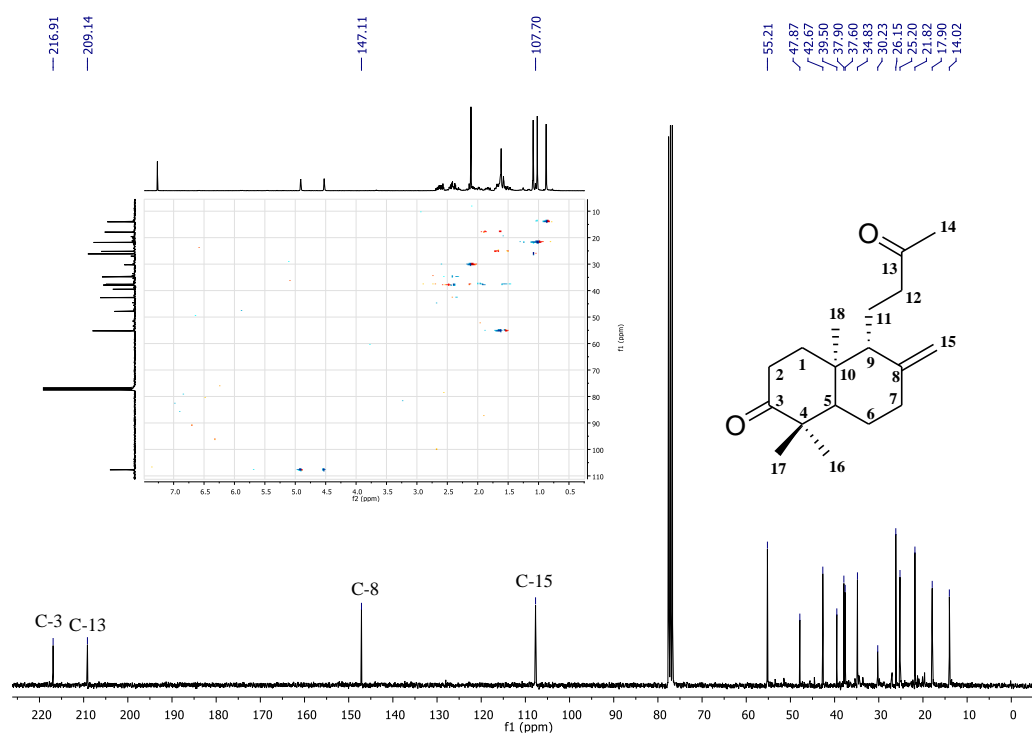
Fonte: Própria autora.

O produto da reação de **AHC** com PCC corresponde a uma substância atípica para esta reação. Espectros de RMN ¹³C e bidimensionais de **VM-18** (Figura 46) permitiram observar que a oxidação aconteceu em C-3, como esperado, mas também em C-13. Ao se analisar o espectro de RMN de ¹³C e HSQC-dept de **VM-18** observa-se a presença de 18 carbonos, ou seja, dois carbonos a menos que o produto de partida.

Deslocamentos típicos do precursor, como os dos carbonos insaturados da cadeia lateral (C-13 e C-14) não são observados no espectro RMN de ¹³C, como evidenciado na figura 47. Entretanto, dois valores de deslocamentos químicos característicos de carbonos carbonílicos estão presentes, δ 216,9 e 209,1 ppm, que puderam ser atribuídos aos carbonos C-3 e C-13, respectivamente, através de espectros de HMBC.

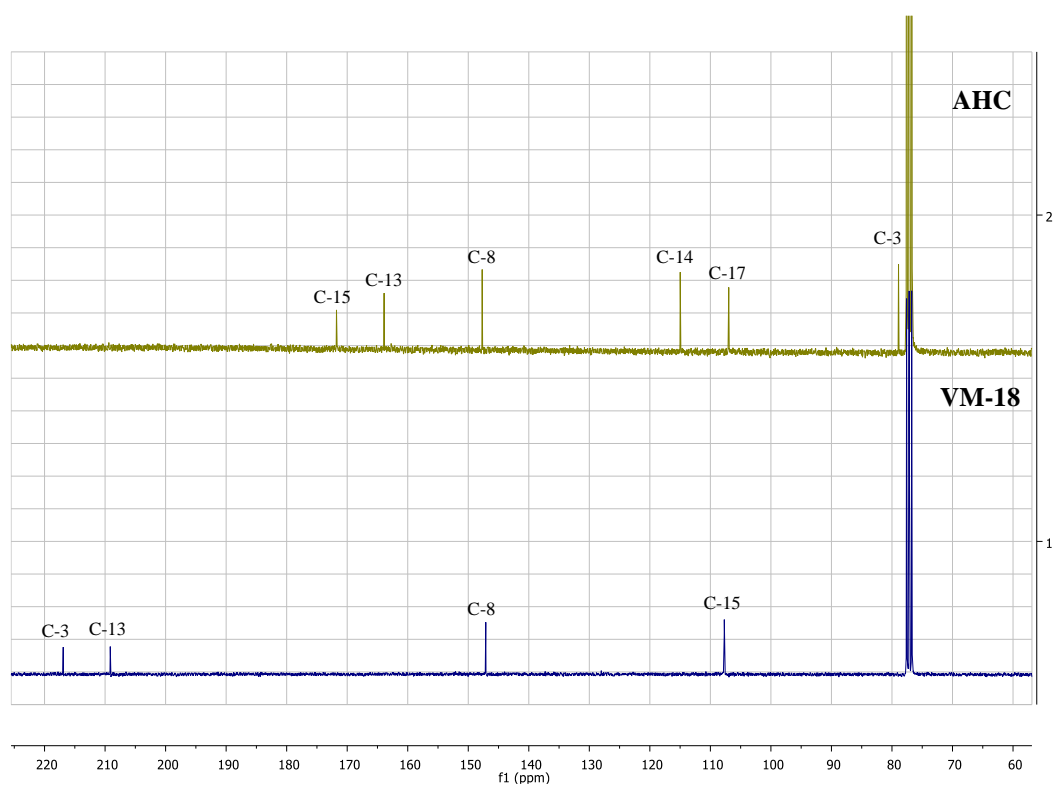
A comparação entre os espectros de RMN de ¹H de **AHC** e **VM-18** (Figura 48) permite observar o desaparecimento do sinal de hidrogênio mais deslocado [5,67 ppm (H-14)] e do sinal de um hidrogênio de grupo metínico [3,28 ppm (H-3)].

Figura 46: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), HSQC-dept e estrutura molecular de VM-18.



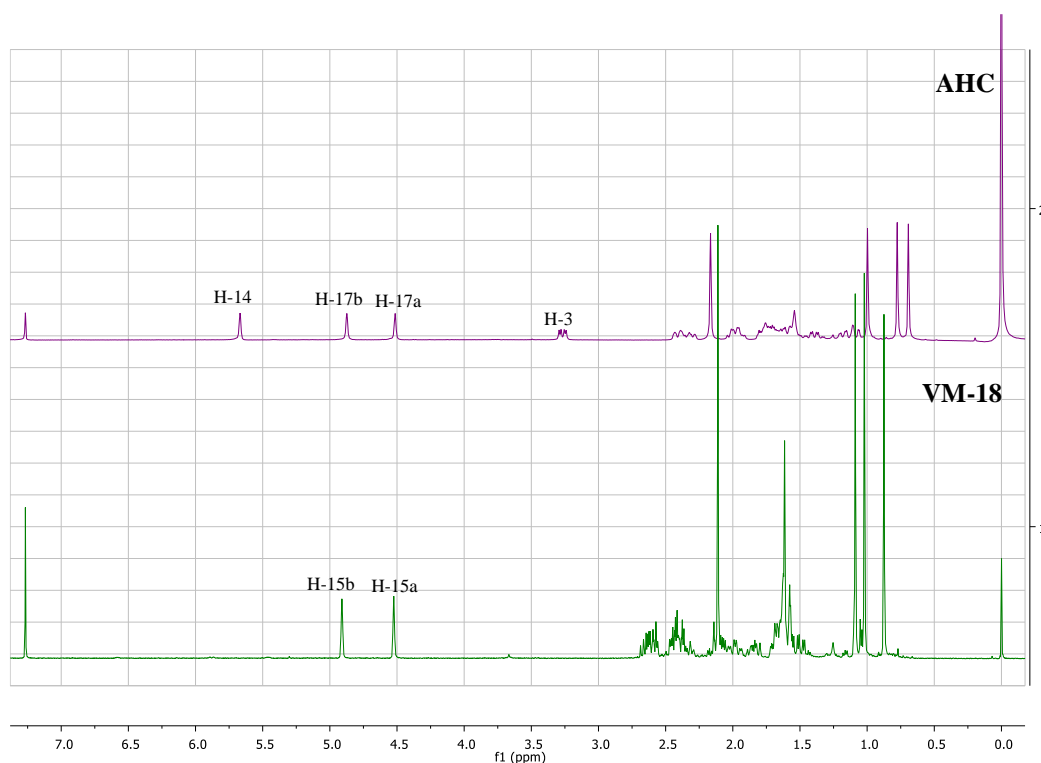
Fonte: Própria autora.

Figura 47: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de AHC e VM-18.



Fonte: Própria autora.

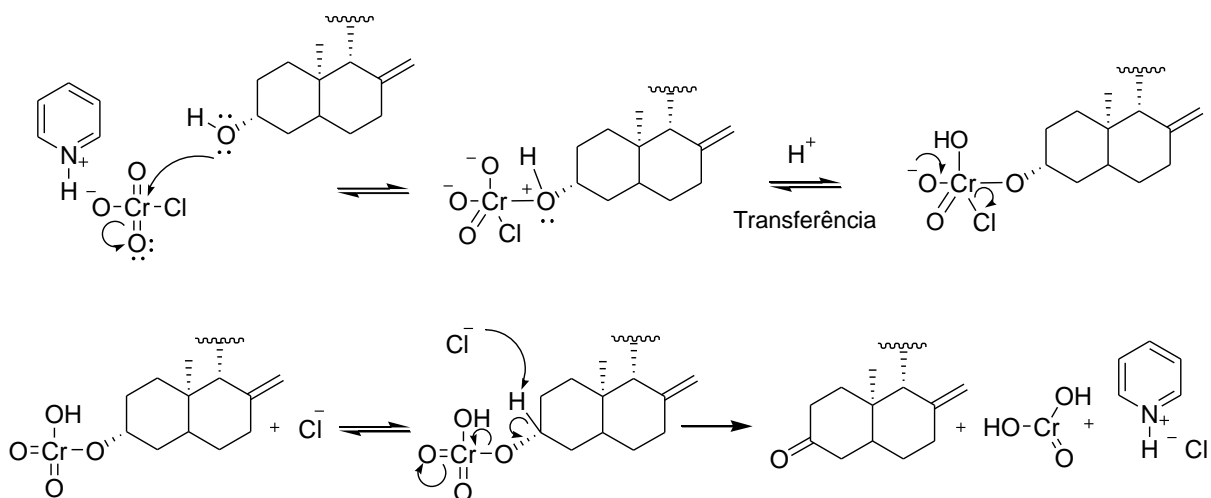
Figura 48: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AHC e VM-18.



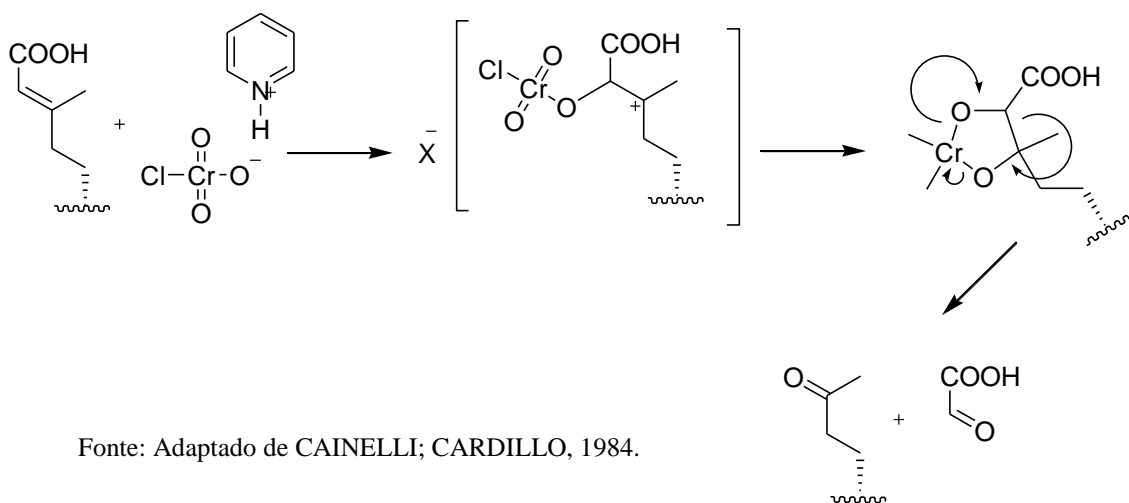
Fonte: Própria autora.

O clorocromato de piridínio (PCC) é um agente oxidante geralmente empregado na oxidação de álcoois primários e secundários a aldeídos e cetonas, respectivamente (WANG, 2010). O mecanismo da reação é semelhante ao de outros reagentes baseados em cromo, onde evidências cinéticas apontam que a oxidação opera através de um intermediário, éster de cromato, que evolui para um aldeído ou cetona, conforme pode ser observado no esquema 7 (TOJO et al., 2006).

Além da oxidação do álcool secundário de C-3 à cetona, observou-se também a clivagem oxidativa da cadeia lateral, possivelmente no sistema olefínico (C-13 e C-14). Embora alcenos possam ser oxidados com PCC, normalmente é necessário o emprego de condições reacionais mais drásticas para que isso aconteça, como excesso do agente oxidante, longos tempos reacionais e aquecimento. Dessa maneira, considerando que as condições empregadas para a oxidação de álcoois normalmente são bastante brandas, a não ser que sejam ricos em elétrons, dificilmente alcenos conseguirão competir com tais substratos (TOJO et al., 2006).

Esquema 7: Mecanismo de oxidação do álcool secundário de **AHC** a cetona.

As condições reacionais empregadas na oxidação de **AHC** foram brandas e controladas, de maneira que a clivagem oxidativa pode ser associada à presença de uma olefina rica em elétrons na cadeia lateral da substância. O mecanismo proposto passa pela formação de um éster de cromato, comum a todos reagentes de cromo, e em seguida prováveis rearranjos moleculares podem estar envolvidos até a eliminação do ácido (Esquema 8).

Esquema 8: Mecanismo proposto de clivagem da cadeia lateral de **AHC**.

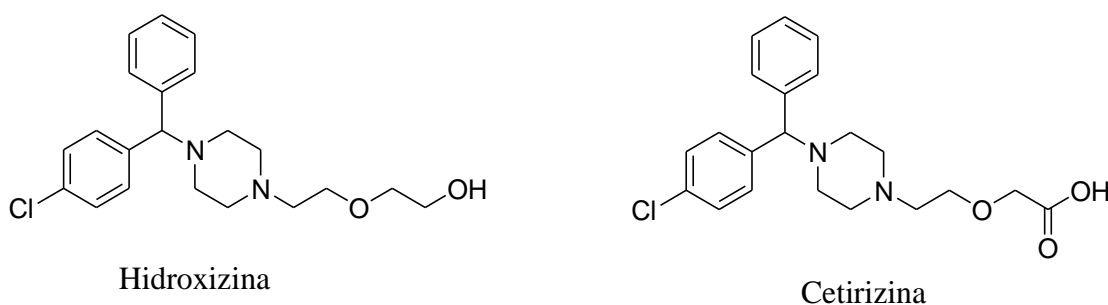
Fonte: Adaptado de CAINELLI; CARDILLO, 1984.

4.3.5. Desproteção

Os ácidos caboxílicos são protegidos por diferentes motivos, dentre eles está mascarar o próton ácido, de forma que não interfira em reações catalisadas por base. Ademais um grupo protetor tem a capacidade de mascarar o grupamento carbonila evitando reações de adições nucleofílicas. Um bom grupo protetor é aquele que pode ser removido seletivamente, com bom rendimento, por reagentes prontamente disponíveis e que não ataquem o grupo funcional regenerado (WUTS; GREENE, 2007).

A importância de se regenerar o ácido carboxílico se deve à sua influência na solubilidade molecular, além de realizar fortes interações iônicas, após absorvidos, com os aminoácidos básicos de enzimas e receptores. Um exemplo clássico de alteração da solubilidade é encontrado na história dos anti-histamínicos. A primeira geração dessa classe de fármacos continha substâncias com caráter lipofílico, que por consequência atravessavam a barreira hematoencefálica e causavam sedação. A segunda geração de anti-histamínicos foi planejada de modo a apresentar maior caráter hidrofílico, tendo-se obtido sucesso principalmente devido à substituição de um álcool por um ácido carboxílico (Figura 49) (WERMUTH et al., 2015).

Figura 49: Anti-histamínicos de primeira (hidroxizina) e segunda geração (cetirizina).

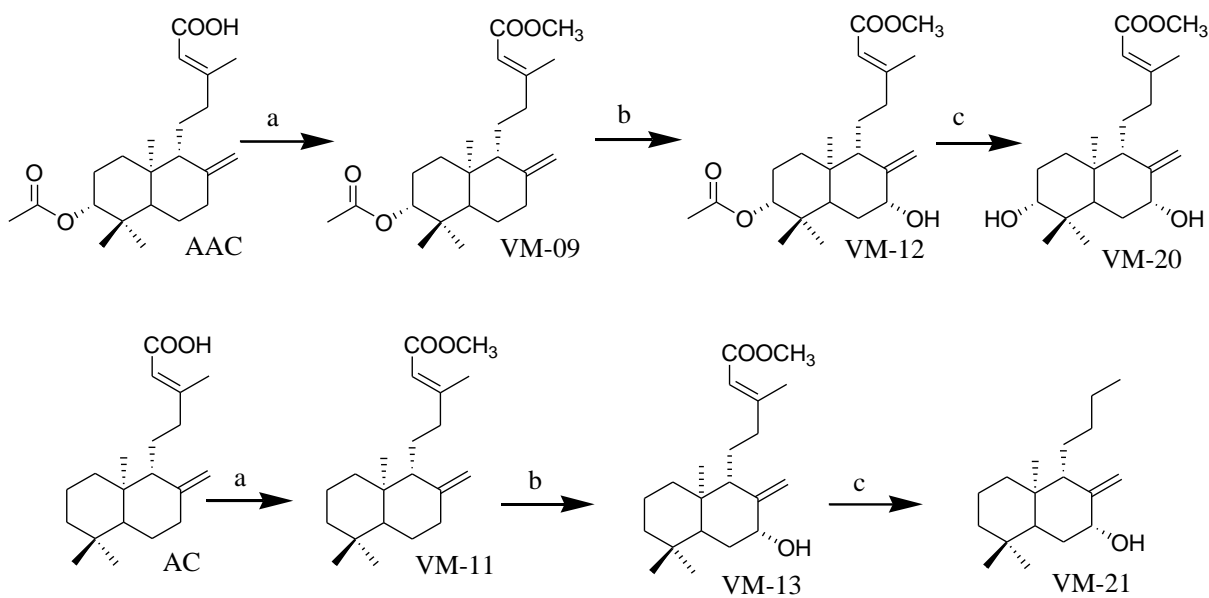


Fonte: WERMUTH et al., 2015.

Considerando a potencial relevância de ácidos carboxílicos para a atividade biológica de moléculas orgânicas, reações de desproteção dos derivados esterificados de **AC** e **AAC** foram realizadas com o objetivo de regenerar esse grupamento funcional e permitir a avaliação de sua importância para as atividades citotóxica, anti-inflamatória e antibacteriana. Entretanto, como observado no esquema 9, tais reações não obtiveram o êxito desejado, sendo formados produtos diferentes do esperado.

A desproteção do ácido carboxílico foi realizada em meio básico utilizando solução saturada de NaOH em MeOH para obtenção de **VM-20** (62%) e de **VM-21** (65,5%) a partir de **VM-12** e **VM-13**, respectivamente.

Esquema 9: Desproteção dos derivados esterificados de AAC e AHC.



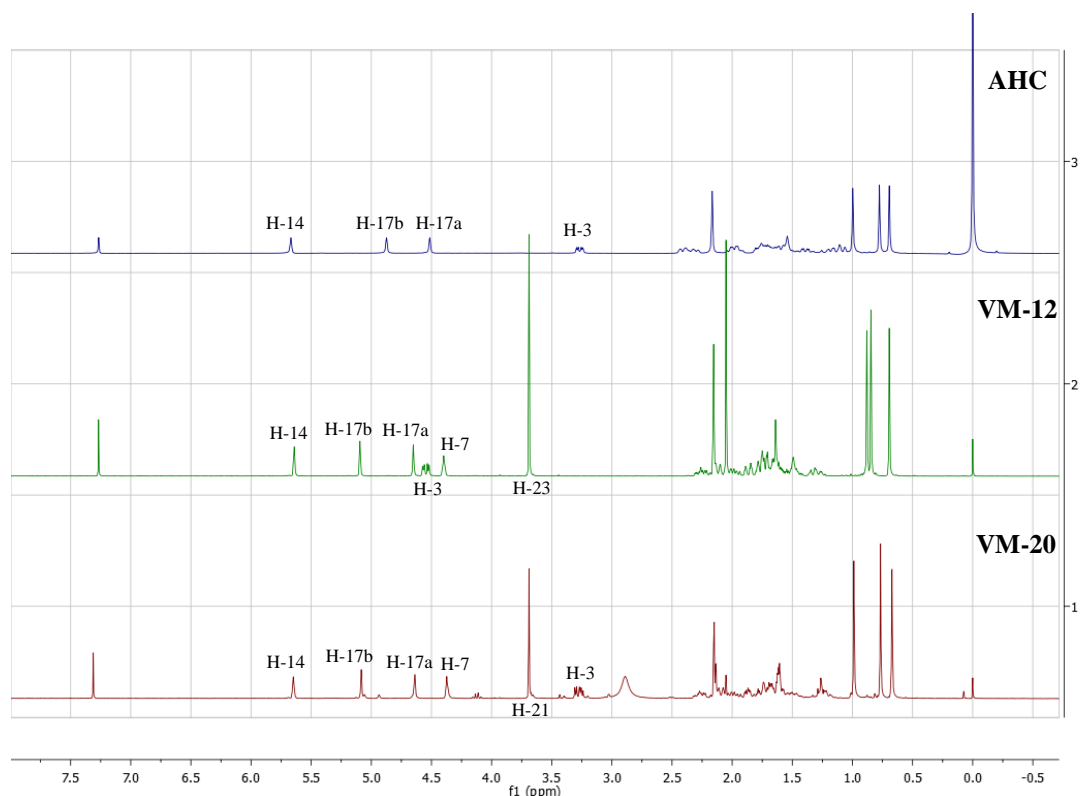
Fonte: Própria autora.

Notas: Reagente e condições – (a) CH_3I , K_2CO_3 , 65°C , acetona; (b) SeO_2 , $t\text{-BuOOH}$, DCM; (c) NaOH, MeOH.

A identificação de **VM-20** foi realizada através de análise do espectro de RMN ^1H em comparação com os espectros de **AHC** e **VM-12** (Figura 50). Nesse espectro nota-se a presença do éster metílico em 3,69 ppm, assim como observado em seu precursor **VM-12**, permitindo afirmar que o processo de desproteção não foi efetivo. Nota-se também a ausência da metila do grupamento acetila (2,06 ppm) e o aparecimento de um sinal de hidrogênio na mesma região do espectro de **AHC**. Dessa maneira, pode-se inferir que ocorreu a hidrólise do grupamento acetoxi ligado à C-3, com a formação de um álcool secundário (3,27 ppm).

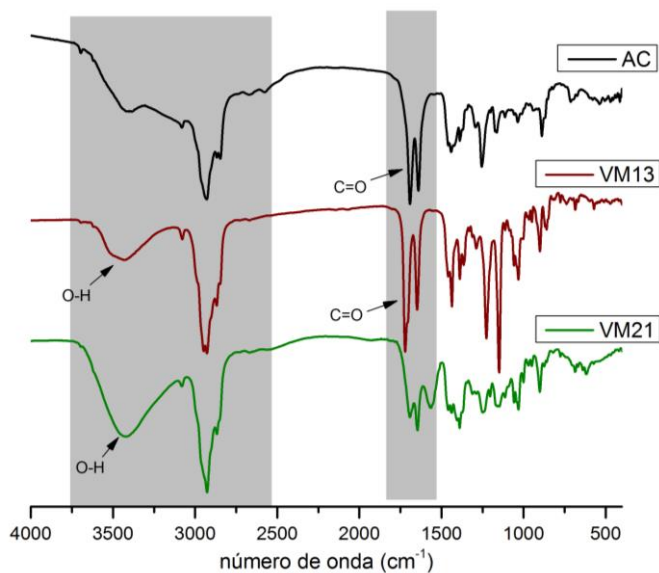
Ao se comparar os espectros no IV de **AC** e **VM-21** (Figura 51), percebe-se ausência da banda larga de O-H característica de ácido carboxílico e da banda referente a deformação axial de C=O, podendo-se sugerir a ausência do grupamento ácido na estrutura. Entretanto, percebe-se a presença de uma deformação axial de O-H em 3437 cm^{-1} , que pode ser atribuída à presença de hidroxila na molécula.

Figura 50: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AHC**, **VM-12** e **VM-20**.



Fonte: Própria autora.

Figura 51: Espectro no infravermelho (KBr) de **AC** e **VM-21**.



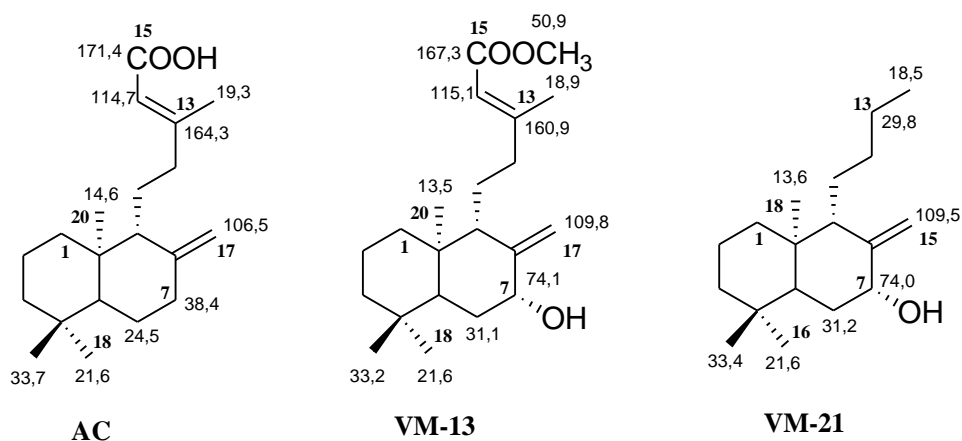
Fonte: Própria autora.

Ao se observar o espectro de RMN de ^{13}C de **VM-21** nota-se a presença de 18 carbonos, dois a menos que o esperado caso **VM-13** tivesse sido efetivamente desprotegido. Nas tabelas 9 e 10 observa-se a comparação entre os principais valores de deslocamento

químico de **VM-21**, **AC** e **VM-13**, onde é possível notar a ausência dos deslocamentos característicos de carbono carbonílico e de instauração da cadeia lateral para **VM-21**.

No espectro de RMN de ^1H nota-se a ausência do hidrogênio mais deslocado (5,67 ppm em **AC**), característico do sistema olefínico da cadeia lateral. Esses resultados permitem inferir que houve a perda do ácido carboxílico e do sistema olefínico da cadeia lateral, como mostrado na figura 52 abaixo.

Figura 52: Estrutura do **AC**, **VM-13** e **VM-21** comparando os dados de RMN ^{13}C .



Fonte: Própria autora.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **AC**, **VM-13** e **VM-21**.

^{13}C	AC δc	VM-13 δc	VM-21 δc
6	24,5	31,1	31,2
7	38,4	74,1	74,0
13	164,3	160,9	29,8
14	114,7	115,1	18,5
15	171,4	167,3	109,7
16	19,3	18,9	21,6
17	106,5	109,8	33,4
18	21,6	21,6	13,6
19	33,7	33,2	
20	14,6	13,5	
21		50,9	

Fonte: Própria autora.

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AC**, **VM-13** e **VM-21**.

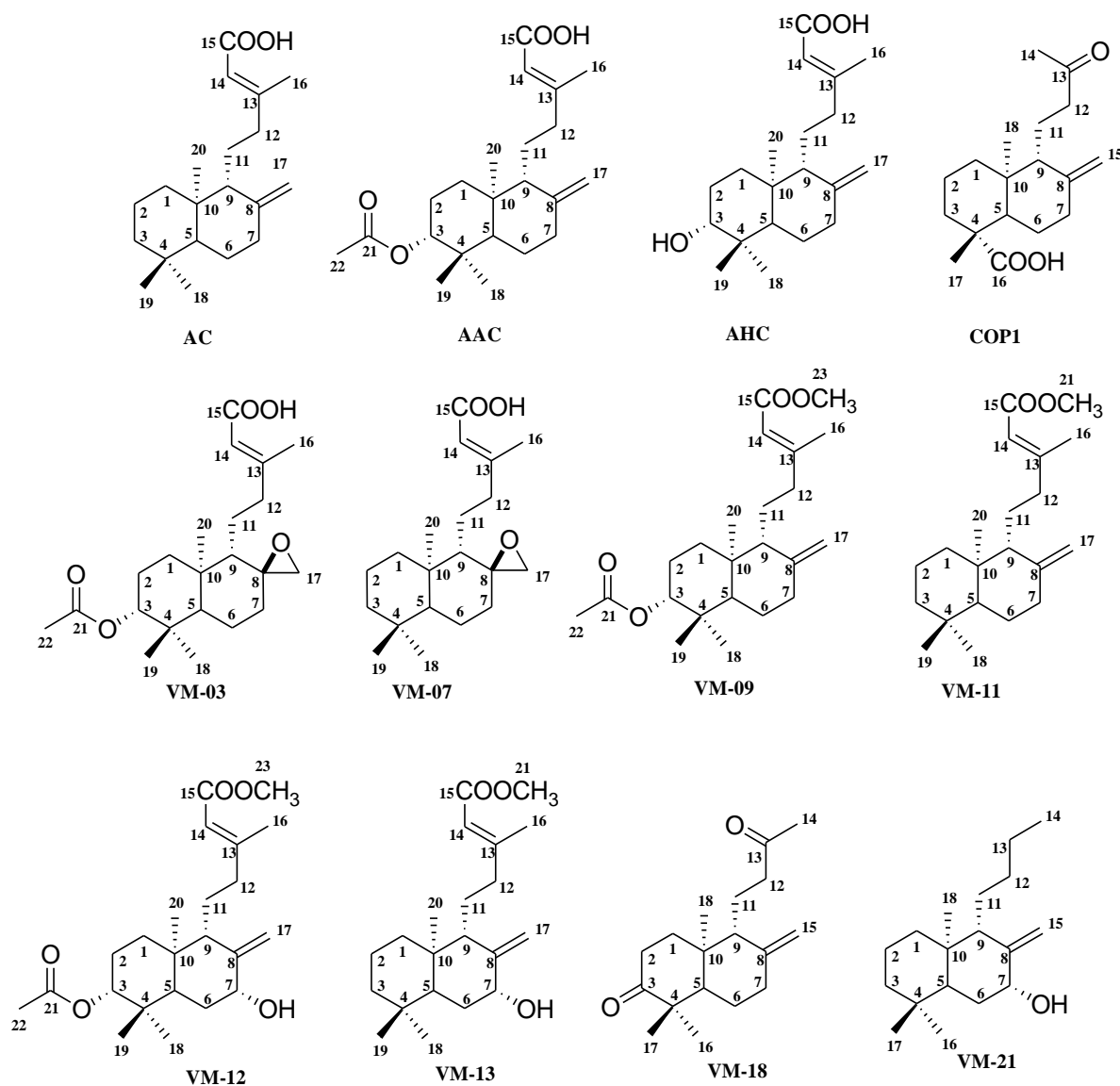
^1H	AC δH (J em Hz)	VM-13 δH (J em Hz)	VM-21 δH (J em Hz)
2b	1,56 m	1,80m	1,80m
2a	1,50 m	1,52m	1,53m
5	1,11 m	1,60m	1,58m
6b	1,55 m	1,88dd (10,7 e 2,6)	1,85s
6a	1,32 m	1,55m	1,54m
7b	2,38 m	4,38sl	4,36sl
7a	2,04 m	-	-
8	-	-	-
9	1,60 m	2,12m	2,08s
13a	-	-	1,25m
13b	-	-	
14	5,67s	5,65sl	2,08s
15^a	-	-	5,05sl
15b	-	-	4,61sl
16	2,17 s	2,16d (1,2)	0,79s
17b	4,85 sl	5,07sl	0,86s
17^a	4,49 sl	4,63sl	0,66s
18	0,80 s	0,80s	-
19	0,87 s	0,88s	-
20	0,68 s	0,66s	-
21	-	3,68s	-

Fonte: Própria autora.

4.4.ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os diterpenos naturais e semissintéticos avaliados quanto à potencial atividade anti-inflamatória, citotóxica e antibacteriana são apresentados na Figura 53.

Figura 53: Diterpenos naturais e semissintéticas utilizados nos ensaios de atividades biológicas.



4.4.1. Atividade anti-inflamatória

4.4.1.1. Introdução

O processo inflamatório é considerado como uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos e condições nocivas, como infecção, lesão tecidual, estresse ou mau funcionamento do tecido. A inflamação tem como objetivo remover ou sequestrar a fonte de perturbação, permitindo ao hospedeiro se adaptar às condições anormais e, por fim, restaurar a funcionalidade e a homeostase do tecido. Uma resposta inflamatória controlada

é apontada como benéfica ao hospedeiro, podendo, por exemplo, atuar na proteção contra agentes infecciosos. Apesar de positiva uma resposta inflamatória desregulada pode ser prejudicial acarretando em danos teciduais, ou até mesmo choque séptico (MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória se inicia com uma inflamação aguda podendo ou não evoluir para a fase crônica. A inflamação aguda é definida como uma série de respostas teciduais que podem ocorrer nas primeiras horas após lesão ou infecção (agentes indutores) (CHADWICK; GOODE, 2004). Assim, ao ser desencadeada por agentes indutores, vias de sinalização envolvidas nessa fase geram o fornecimento coordenado de componentes do sangue (plasma e leucócitos) ao local da infecção ou lesão (CHADWICK; GOODE, 2004; MEDZHITOV, 2008). O reconhecimento inicial da infecção é mediado por macrófagos e mastócitos residentes no tecido, levando à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, como quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas. Esses mediadores induzem rapidamente um exsudato inflamatório ao local acometido pela infecção, sendo constituído por proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos), anteriormente restritos aos vasos sanguíneos. Os neutrófilos extra vasculares ativados liberam seus conteúdos tóxicos presentes nos grânulos (espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio) na tentativa de eliminar o agente invasor. Esses efetores não atuam de forma específica, podendo acarretar em danos também ao hospedeiro (MEDZHITOV, 2008). Tais conjuntos de alterações teciduais, como ativação de células e liberação de mediadores inflamatórios acarretam nos clássicos sinais da inflamação: dor, rubor, calor, edema e perda da função (MEDZHITOV, 2008; SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Quando bem-sucedida uma resposta inflamatória aguda resulta na eliminação dos agentes infecciosos, seguida por uma fase de resolução e reparo, que é mediada principalmente por macrófagos residentes em tecidos e recrutados. A alteração nos mediadores inflamatórios lipídicos das prostaglandinas (pró-inflamatórias) para as lipoxinas (anti-inflamatórias), é fundamental para a mudança de inflamação para resolução (MEDZHITOV, 2008).

Caso a resposta inflamatória aguda não acarrete na eliminação do patógeno, a inflamação persistirá e novas características serão adquiridas, como a substituição do infiltrado neutrofílico por macrófagos e, em caso de infecção, também por células T. Se ainda insuficiente, um estado inflamatório crônico é desencadeado, com a formação de

granulomas e tecidos linfoides terciários. Nessa fase a característica do estado inflamatório dependerá da classe efetora de células T (MEDZHITOV, 2008).

As citocinas possuem um importante papel na regulação do processo inflamatório, induzindo a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos, promovendo o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, na resposta inflamatória aguda (TAYAL; KALRA, 2008). A presença de elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α ou IL-1, estimulam a produção de óxido nítrico (NO) nos tecidos. Ademais, no caso de infecção bacteriana, o LPS é outro forte indutor da síntese de NO (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; SHARMA et al., 2007).

O NO é uma molécula de sinalização que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação, sendo considerado um mediador pró-inflamatório, exercendo sua função através de múltiplos mecanismos intracelulares (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; SHARMA et al., 2007). No processo inflamatório agudo, o NO é essencial devido a duas ações principais, a de vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular - que tem papel fundamental em tal processo, e à sua ação como agente citotóxico, contra micro-organismos. O NO também interfere no processo inflamatório agudo por inibição da adesão/agregação plaquetária e a adesão leucocitária (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; SHARMA et al., 2007).

Apesar dos efeitos benéficos, as propriedades tóxicas do óxido nítrico são fundamentais na patogênese do choque séptico. A superprodução de NO durante a septicemia é considerada responsável pela hipotensão arterial irreversível, vasoplegia (perda de respostas à noradrenalina), acidose láctica, necrose e apoptose (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

Diversas situações apresentam necessidade de supressão da resposta inflamatória, seja por uma ameaça imediata ou por uma ameaça a longo prazo, como em casos de rejeição a um órgão transplantado. Atualmente a terapêutica dispõe de fármacos não-esteroidais (inibidores das ciclo-oxigenases I e II) que atuam sobre o metabolismo do ácido araquidônico, inibindo a síntese de certos eicosanoides. Apesar de possuírem ação analgésica, antipirética e inibidora da agregação plaquetária, esses fármacos ainda apresentam efeitos limitados na inflamação e com diferentes efeitos adversos nos sistemas do organismo, em especial, gastrointestinal e cardiovascular (BURQUE; SMYTH; FITZGERALD, 2006; CHADWICK; GOODE, 2004).

Como exposto, as doenças inflamatórias são caracterizadas por vários fatores que agregados a diferentes causas constituem diversos alvos para seu tratamento. Dessa maneira, a busca contínua por alternativas terapêuticas mais eficientes e com diferentes mecanismos de ação para seu tratamento mostra-se relevante diante das opções terapêuticas atuais.

4.4.1.2. Avaliação da citotoxicidade frente a células RAW264.7.

Ao se avaliar a potencial atividade anti-inflamatória de uma substância, *in vitro*, é fundamental a determinação de sua citotoxicidade frente a linhagem de células normais empregadas, pois uma reduzida produção de NO pode ser consequência de uma baixa viabilidade celular causada pela substância.

Avaliado frente a linhagens de fibroblastos humanos primários, o diterpeno **AC** não apresentou citotoxicidade na concentração máxima avaliada (62,5 μM) (FONSECA et al., 2013; SOUZA et al., 2011b). Já Abrão et al. (2015) descreveram redução de 50% da viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) na concentração de 144,6 μM quando avaliados frente a **AC**. No presente trabalho, dentre os diterpenos naturais isolados de ORC, apenas **AC** e **AAC** reduziram a viabilidade celular de RAW264.7 quando avaliados na maior concentração, com reduções de 30-40% (Figura 56).

Já em relação aos análogos obtidos, **VM-07** (100 μM) e **VM-12** (100 μM) apresentaram viabilidade celular de cerca de 75 e 65%, respectivamente. As substâncias **VM-09** (100 μM) e **VM-13** (50 e 100 μM) mostraram reduções drásticas na viabilidade celular, com viabilidade menor que 10% (Figura 57).

Figura 54: Viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos naturais.

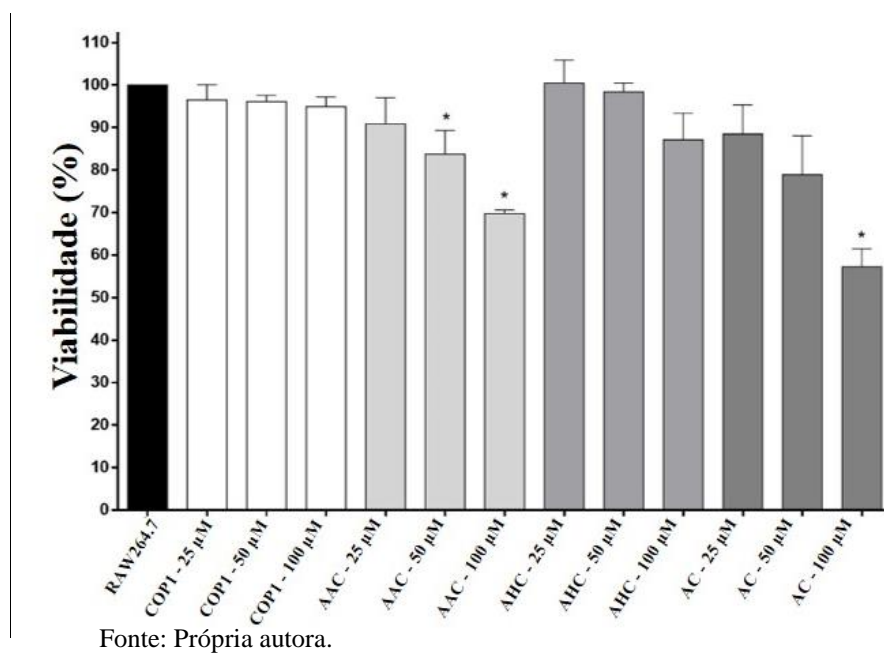
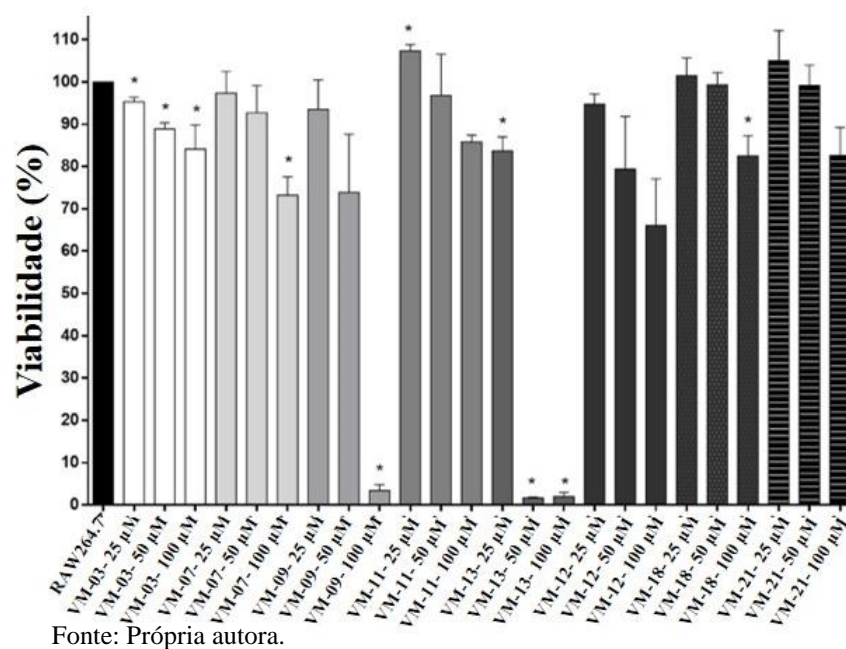


Figura 55: Viabilidade celular de macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos semissintéticos.



4.4.1.3. Avaliação da potencial atividade anti-inflamatória de diterpenos naturais e semissintéticos

O potencial das substâncias em reduzir a produção de NO foi avaliado através do método de Griess, empregando cultura de células RAW264.7 estimulada com LPS (1 µg/mL) e IFN-γ. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras 58 e 59.

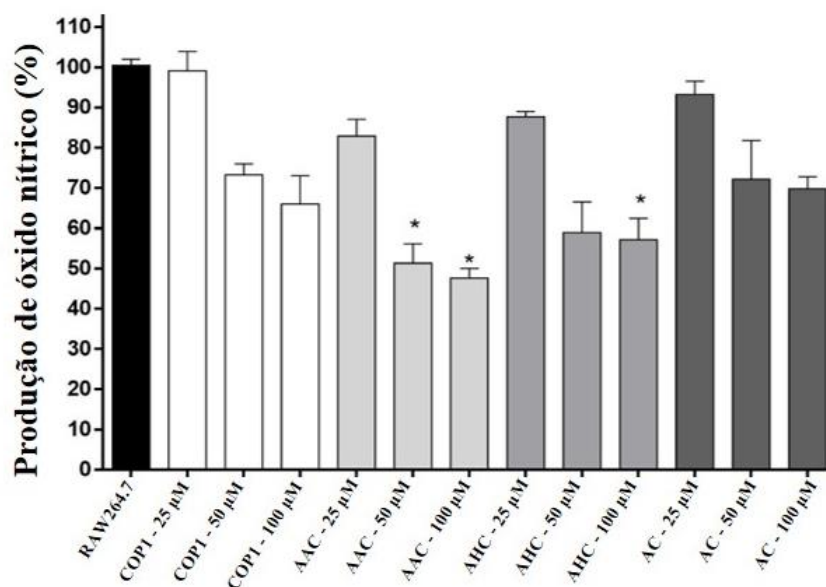
Dentre os diterpenos naturais, reduções significativas na produção de NO foram observadas para **AAC** e **AHC**. Na concentração de 50 µM, o primeiro inibiu em cerca de 50% a produção de NO, enquanto o segundo, resultou em uma inibição de aproximadamente 45% na concentração de 100 µM. Estudo desenvolvido por Vargas et al. (2015) avaliou a produção de NO por macrófagos murinos (J774) estimulado com LPS, quando tratados com **AC**, **AAC** e **AHC**. Na concentração de 164 µM, **AC** reduziu em 98,5% a produção NO, enquanto **AHC** (156 µM), reduziu esta em cerca de 50%. Não foi observada redução significativa na produção NO para o **AAC**.

No presente estudo, **AAC** e **AHC** apresentaram citotoxicidade inferior a **AC** frente a macrófagos RAW264.7 e significativa redução da produção de NO. Dessa maneira, é possível sugerir que a presença de substituinte em C-3 ou de um caráter mais hidrofílico nessa região poderia ser relevante para essa atividade.

Entre os derivados semissintéticos avaliados, três provocaram redução significativa na produção de NO pelas células RAW264.7. **VM-09** e **VM-11**, ambos na concentração de 100 µM, mostraram redução de cerca de 95 e 70% da produção de NO, enquanto **VM-13**, nas concentrações de 50 e 100 µM, provocou redução superior a 90%. Apesar da importante ação sobre a produção de NO, **VM-09** e **VM-13** apresentaram elevada citotoxicidade frente a macrófagos RAW264.7, de maneira que a potencial atividade anti-inflamatória não pode ser estimada.

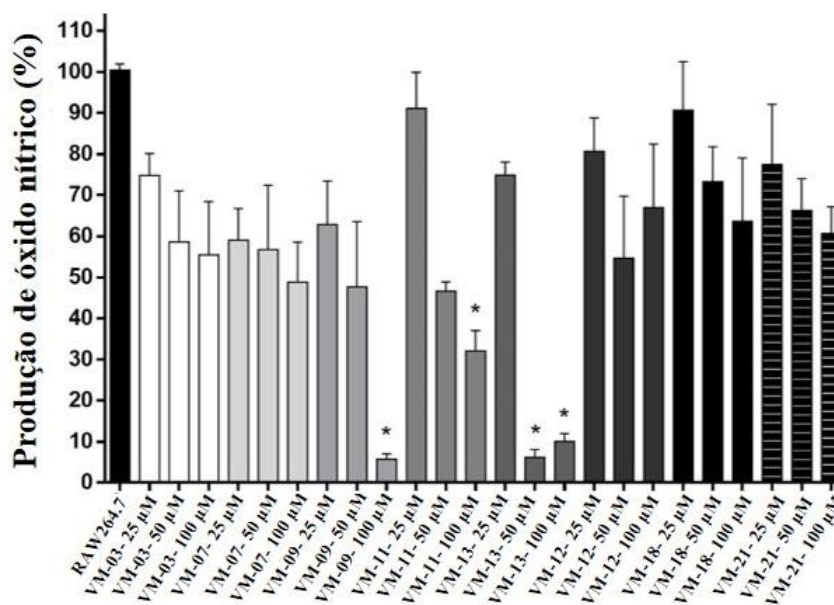
Em resumo, pode-se sugerir que a presença de substituinte ou de um caráter mais hidrofílico em C-3 e a presença de um éster ou ausência do ácido carboxílico em C-15 possam contribuir para a maior redução da produção de NO por macrófagos RAW264.7. Entretanto, faz-se necessária a avaliação de um maior número de derivados, com maior variedade de modificações estruturais, a fim de estabelecer com maior precisão os requisitos estruturais associados à atividade.

Figura 56: Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos naturais.



Fonte: Própria autora.

Figura 57: Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 tratados com diterpenos semissintéticos.



Fonte: Própria autora.

4.4.2. Atividade citotóxica

4.4.2.1. Introdução

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2019).

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, a estimativa é de aproximadamente 9,6 milhões de óbitos no ano de 2018 (WHO, 2019). Em especial, o câncer de pulmão tem sido responsável por grande parte desses óbitos (~1,8 milhão), sendo o carcinoma pulmonar de células não pequenas responsável por aproximadamente 80% de todas as vítimas de câncer de pulmão, das quais o adenocarcinoma é o principal subtipo. A maioria dos casos de adenocarcinoma pulmonar é geralmente diagnosticado como doenças localmente avançadas ou metastáticas (FERLAY et al., 2013; XIE et al., 2019).

Para o Brasil, estimam-se 18.740 e 12.530 casos novos de câncer de pulmão entre homens e mulheres, respectivamente, para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 18,16 casos novos a cada 100 mil homens, sendo o segundo tumor mais frequente; e com um risco estimado de 11,81 para cada 100 mil mulheres, ocupando a quarta posição (INCA, 2019).

Em relação à mortalidade em decorrência de câncer de pulmão, estima-se que para os homens o número seja de 15.514 óbitos e para as mulheres de 10.978. Para o sexo masculino esse tumor é responsável pelo maior número de mortes, enquanto para o sexo feminino é o segundo mais letal (INCA, 2019).

A quimioterapia é o método mais utilizado no tratamento do câncer de pulmão seguido de radioterapia e cirurgia (geralmente em estágios iniciais) (DATTA et al., 2017). Entre os quimioterápicos, a cisplatina e o paclitaxel são os fármacos de primeira linha empregados no tratamento do câncer de pulmão. O paclitaxel é um inibidor mitótico e agente indutor de apoptose, enquanto a cisplatina além de induzir a apoptose por interferir na replicação do DNA, também promove a morte celular autofágica (LIU et al., 2013). Docetaxel e pemetrexedo são alternativas terapêuticas importantes para o tratamento de câncer de pulmão (WANG et al., 2016).

Apesar da disponibilidade de diferentes quimioterápicos para o tratamento, os cânceres de pulmão frequentemente exibem resistência intrínseca e adquirida aos fármacos

(PARK et al., 2017). Dessa maneira, considerando a grande incidência e mortalidade associadas ao câncer de pulmão e a resistência aos fármacos utilizados, faz-se necessário e urgente a identificação de novos agentes quimioterápicos.

4.4.2.2. Avaliação da atividade citotóxica das substâncias naturais e semissintéticas sobre as células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549)

A viabilidade de células A549 na presença de diterpenos naturais ou semissintéticos foi avaliada em três diferentes concentrações, pelo método do MTT. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 54 e 55.

Entre os diterpenos naturais observa-se reduzida atividade citotóxica frente a células A549. Apenas **AC** apresentou redução expressiva da viabilidade celular, porém apenas na concentração mais elevada (100 μM). Como discutido anteriormente, diversos estudos descrevem fraca atividade citotóxica para **AC**, **AAC** e **AHC** frente a linhagens de células tumorais (ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013; IZUMI et al., 2012; LIU; NAIR, 2011; SARTORELLI et al., 2010; TINCUSI et al., 2002; VARGAS et al., 2015). O melhor resultado foi obtido para **AC** frente à linhagem de células tumorais HeLa, com $\text{IC}_{50} = 44,03 \mu\text{g/mL}$ (144,60 μM), inferior ao quimioterápico etoposídeo (ABRÃO et al., 2015).

Em relação aos derivados semissintéticos, apesar da redução de viabilidade ter sido estatisticamente relevante para a grande maioria das substâncias, foram obtidos resultados promissores apenas para **VM-13**. Na concentração de 25 μM , a substância provocou redução de viabilidade celular na ordem de 10%; à 50 μM a viabilidade celular foi de cerca de 45% e na concentração de 100 μM a viabilidade celular foi menor que 10%, ou seja, uma redução superior a 90%. O significativo aumento da atividade citotóxica observado para **VM-13** aponta que a inserção de um substituinte polar em C-7 possa ter forte influência na atividade da molécula, abrindo caminho para novas modificações nessa posição na busca por moléculas mais potentes.

Figura 58: Viabilidade celular de células A549 tratadas com diterpenos naturais.

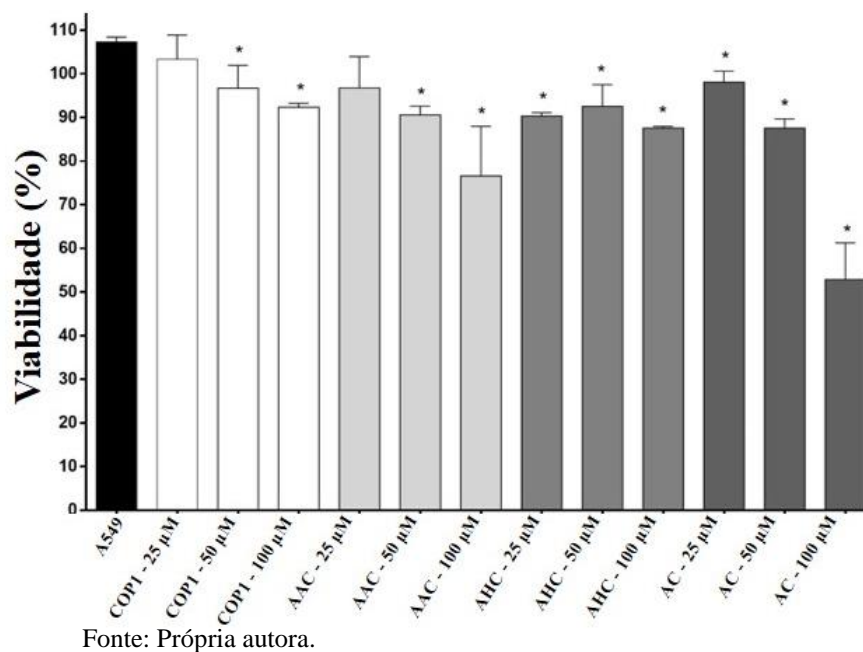
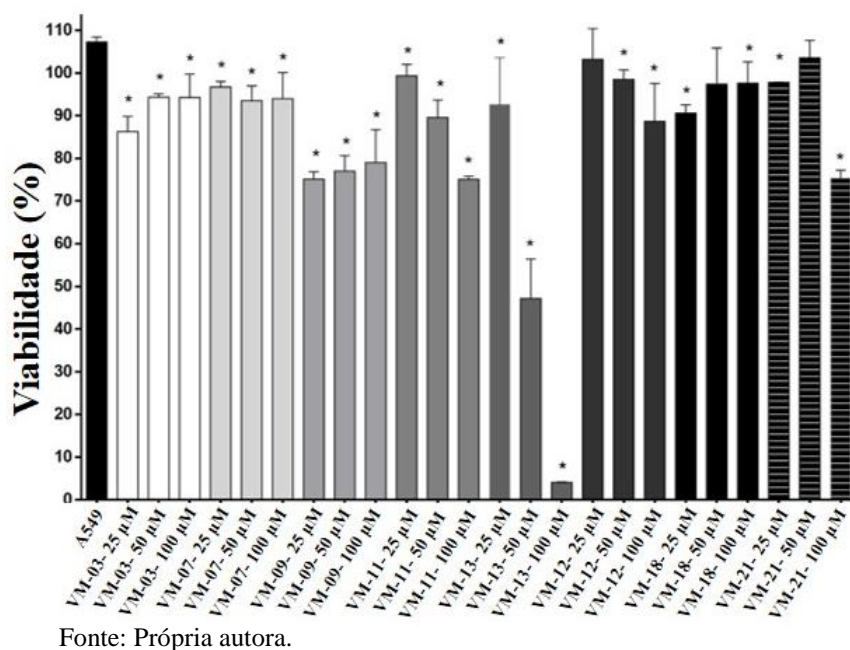


Figura 59: Viabilidade celular de células A549 tratadas com diterpenos semissintéticos.



Apesar da reduzida atividade, ao se comparar os resultados obtidos com as estruturas químicas dos diterpenos avaliados, pode-se inferir regiões das moléculas importantes para a atividade citotóxica. Entre os diterpenos naturais, percebe-se que a presença de substituintes

em C-3 reduz o potencial citotóxico, especialmente a presença de hidroxila. Com isso pode-se sugerir que um caráter mais hidrofóbico nessa região possa ser importante para a atividade avaliada.

Tincusi et al. (2002) descrevem que **AC** foi inativo frente às linhagens tumorais P-388, A-549, HT-29 e MEL-28, enquanto seu éster metílico (**1**) (Figura 9) apresentou atividade antiproliferativa com valores de IC_{50} iguais a 2,5 (7,8 μ M), 5 (15,7 μ M), 5 e 10 μ g/mL (31,4 μ M), respectivamente. No presente trabalho foram sintetizados e avaliados quanto à atividade citotóxica os ésteres metílicos de **AAC (VM-09)** e **AC (VM-11)**. Ambas substâncias apresentaram atividade inferior a dos precursores, especialmente frente ao **AC**, com redução de atividade em todas as concentrações testadas. Outros diterpenos que não possuem ácido carboxílico na cadeia lateral, como **COPI**, **VM-18** e **VM-21** também apresentaram menor influência na viabilidade de células A549, sugerindo que o grupamento ácido na cadeia lateral possa ser importante para a atividade citotóxica.

Em resumo, pode-se sugerir que a ausência de substituinte em C-3, a presença de ácido carboxílico em C-15 e especialmente a presença de uma hidroxila em C-7, são padrões importantes para a atividade citotóxica frente à linhagem celular A549. Entretanto faz-se necessária a avaliação de um maior número de derivados, com maior variedade de modificações estruturais, a fim de estabelecer com maior precisão os requisitos estruturais associados à atividade.

4.4.3. Atividade antibacteriana

4.4.3.1. Introdução

As bactérias são seres microscópicos e unicelulares, com organização celular simples classificadas como seres procarióticos. Tais micro-organismos são capazes de acarretar inúmeras doenças aos seres humanos, acometendo desde órgãos superficiais, como a pele, até órgãos fundamentais, como o cérebro, podendo ainda desencadear infecções localizadas ou não (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana de grande importância médica, sendo frequentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Essa bactéria pode provocar diversas doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque

tóxico, septicemia e outras), sendo responsável por inúmeras infecções hospitalares adquiridas (GIBBONS, 2008; SANTOS et al., 2007).

Outra bactéria importante é a *Escherichia coli*, tipicamente encontrada na microflora intestinal normal de humanos e outros mamíferos, sendo considerada inofensiva. Entretanto em hospedeiros imunocomprometidos ou onde as barreiras gastrointestinais normais são violadas, essa bactéria pode causar diversas doenças intestinais e extraintestinais - como a peritonite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Bactérias cariogênicas são responsáveis pela cárie dentária, uma das principais doenças bucais que acometem a humanidade. Esta patologia se desenvolve com a formação de um biofilme na superfície do dente (placa dental) que está associado ao crescimento de *Streptococcus sp.* (SOUZA et al., 2011a).

Os fármacos antibacterianos são substâncias químicas com capacidade de suprimir o crescimento de bactérias (bacteriostáticos) podendo, eventualmente, destruí-las (bactericidas) (MADDISON; PAGE; CHURCH, 2008). Desde a descoberta dos primeiros agentes antibacterianos, espécies de bactérias resistentes também passaram a ser encontradas, sendo o uso indiscriminado responsável por espécies bacterianas multirresistentes (ABRÃO et al., 2015). Diante do exposto, a pesquisa por fármacos antibacterianos é de fundamental importância e urgência para a terapêutica.

4.4.3.2. Determinação da CIM de diterpenos naturais e semissintéticos

O potencial antibacteriano de diterpenos naturais e semissintéticos foi avaliado através do ensaio de CIM, por microdiluição, e os resultados estão descritos na tabela 11.

Estudos relatam importante atividade antibacteriana para **AC** e as substâncias relacionadas, **AAC** e **AHC**. **AC** e **AAC** apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, com valores de MIC variando entre 2 - 25 µg/mL e 12 - 180 µg/mL, respectivamente. **AHC** não apresentou atividade frente às espécies testadas e nenhum dos três diterpenos foi ativo frente à *E. coli* (ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013; SOUZA et al., 2011a; TINCUSI et al., 2002).

No presente trabalho, **AC** mostrou a melhor atividade antibacteriana entre os diterpenos testados, com valores de CIM em torno de 30,45 µg/mL (100 µM). O derivado **VM-21**, na maioria dos casos, apresentou CIM semelhante ao **AC**, enquanto as substâncias **VM-03** e **VM-07** apresentaram valores de CIM inferiores a 200 µg/mL. As demais substâncias, em sua maioria, mostraram valores de CIM maiores que 200 µg/mL.

Diferentes estudos observaram que as bactérias Gram-negativas possuem baixa sensibilidade ao **AC** (ABRÃO et al., 2015; FONSECA et al., 2013). No presente trabalho, ao se analisar a tabela 11 pode-se observar que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis quando comparadas à bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*, que se mostrou resistente até mesmo a **AC**. Acredita-se que essa resistência se deva à diferença da constituição da parede celular, pois além da membrana plasmática, as bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular rica em peptidoglicanos. Já as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, uma fina camada intermediária de peptidoglicanos e uma membrana plasmática. Sabe-se que a membrana externa desse grupo de bactérias pode funcionar como uma barreira, dificultando a entrada de substâncias.

Apesar do baixo potencial antibacteriano observado para as substâncias testadas, é possível apontar alguns aspectos estruturais relevantes para a atividade. A comparação da estrutura de **AC** com a dos derivados **VM-09**, **VM-11**, **VM-12** e **VM-13**, permite sugerir que ácido carboxílico da cadeia lateral seja relevante para a atividade antibacteriana. Abrão e colaboradores (2015) também observaram que os metabólitos C-15 esterificados apresentaram ausência de atividade antibacteriana. Assim, a presença de grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio nessa região se mostrou fundamental para a atividade antibacteriana e acredita-se que estes interajam com os peptidoglicanos presentes na parede celular.

Percebe-se que houve uma redução da atividade antibacteriana para os derivados de **AC** C-17 epoxidados (**VM-03** e **VM-07**), o que permite inferir que a dupla exocíclica possa ser importante para a atividade frente às bactérias testadas. Matos et al. (2015), observaram uma melhor atividade do derivado C-17 epoxidado (25 µg/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis* em relação ao seu precursor, **AC** (125 µg/mL), mostrando que, para essa atividade, a dupla exocíclica parece ser menos relevante.

Por fim, comparando somente os metabólitos isolados de ORC, observou-se uma redução considerável na atividade de **AAC** e **AHC** em relação a **AC**, sugerindo que a presença de grupos doadores ou receptores de ligação de hidrogênio na posição C-3 influencie negativamente a atividade antibacteriana. Outros estudos também obtiveram resultados semelhantes, com redução ou perda de atividade antibacteriana para **AHC** e **AAC** (ABRÃO et al., 2015; SOUZA et al., 2011a), permitindo inferir que um caráter mais hidrofóbico nessa região contribua para uma melhor atividade antibacteriana.

Tabela 11: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de diterpenos naturais e semissintéticos.

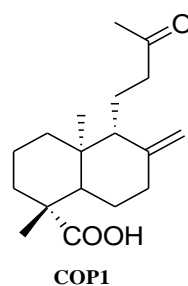
Micro-organismos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) - µg/mL (µM)												
	Substâncias												
	AAC	AHC	AC	VM03	VM07	VM09	VM11	VM13	VM16	VM18	VM21	AP**	CL***
<i>Escherichia coli</i> CDC O126	*	*	*	151,4 (400)	*	*	*	*	*	*	*	1,1 (3,125)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 2564	*	*	30,45 (100)	151,4 (400)	128,2 (400)	*	*	*	*	*	*	< 0,07 (< 0,195)	-
<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449	*	*	30,45 (100)	*	128,2 (400)	*	*	*	*	*	*	-	2,80 (3,125)
<i>Streptococcus mutans</i> CCT 3440	*	*	30,45 (100)	151,4 (400)	128,2 (400)	*	*	133,8 (400)	*	*	32,05 (100)	-	5,6 (6,25)
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261	*	*	30,45 (100)	151,4 (400)	128,2 (400)	*	*	*	*	*	32,05 (100)	-	11,22 (12,5)
<i>Streptococcus salivarius</i> NCTC 8618	*	*	30,45 (100)	151,4 (400)	128,2 (400)	*	*	*	*	*	64,1 (200)	-	11,22 (12,5)
<i>Streptococcus sanguinis</i> NCTC 7863	9,06 (25)	64,1 (200)	15,21 (50)	37,85 (100)	16,0 (50)	9,41 (25)	*	16,72 (50)	78,5 (200)	55,3 (200)	32,05 (100)	-	5,6 (6,25)

Fonte: Própria autora.

Notas: *Valores de CIM superiores a 200 µg/mL; ** ampicilina; *** clorexidina.

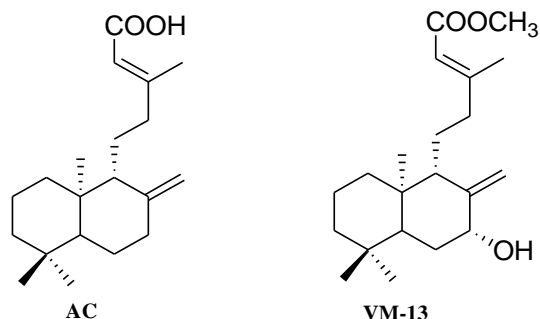
5. CONCLUSÕES

- O presente estudo, empregando o oleorresina de *C. langsdorffii*, permitiu o isolamento de 4 substâncias naturais: ácido copálico (**AC**), ácido 3-acetóxi-copálico (**AAC**), ácido 3-hidróxi-copálico (**AHC**) e o diterpeno inédito para a família Leguminosae, *ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-óico* (**COP1**).

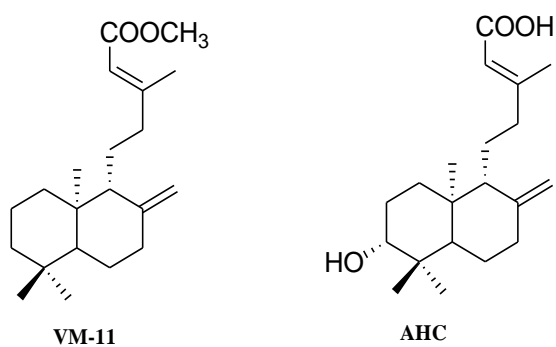


- Os diterpenos **AC**, **AAC** e **AHC** foram empregados como material de partida para a obtenção de nove (9) derivados semissintéticos utilizando-se de estratégias consolidadas em Química Medicinal, como variação e adição de grupos funcionais. Os derivados obtidos a partir de **AC** foram **VM-07** (epoxidação da dupla exocíclica em C-17), **VM-11** (esterificação metílica em C-15), **VM-13** (oxidação alílica em C-7) e **VM-21** (clivagem da cadeia lateral em C-13). Os derivados obtidos a partir de **AAC** foram **VM-03** (epoxidação da dupla exocíclica em C-17), **VM-09** (esterificação metílica em C-15), **VM-12** (oxidação alílica em C-7) e **VM-20** (desproteção da hidroxila em C-3). Considerando a baixa quantidade de **AHC** somente foi possível a obtenção do derivado semissintético **VM-18**, esse derivado foi obtido através da oxidação do álcool secundário à cetona em C-3 e clivagem oxidativa no sistema olefínico da cadeia lateral com a formação de uma cetona em C-13. Dentre os derivados semissintéticos, **VM-03** é considerado inédito, sendo que até o momento nenhum dos derivados obtidos haviam sido avaliados quanto as atividades citotóxica e anti-inflamatória, com exceção apenas de **VM-11** frente a atividade citotóxica.
- Doze diterpenos, quatro naturais e oito semissintéticos, foram avaliados quanto à atividade citotóxica frente à linhagem tumoral A549. Dentre as substâncias naturais, o **AC** apresentou o melhor resultado, com redução da viabilidade celular em torno de 50% na concentração de 100 μ M. Entretanto, o resultado mais relevante foi observado para o derivado semissintético **VM-13**, com diminuição de aproximadamente 95% da viabilidade celular a 100 μ M. Os resultados encontrados para a substância são bastante promissores e

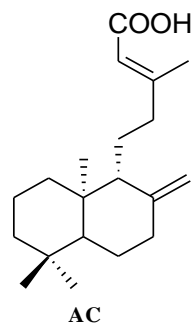
abrem caminho para o planejamento de novas moléculas na busca por novos fármacos antineoplásicos.



- Doze diterpenos, quatro naturais e oito semissintéticos, foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória. **VM-11** e **AHC** foram as substâncias com melhores resultados para redução da produção de NO por macrófagos RAW264.7. Essas substâncias, a 100 μM reduziram em torno de 70 e 40% a produção de NO, respectivamente. Os resultados encontrados para a substância são bastante promissores e abrem caminho para o planejamento de novas moléculas na busca por novos fármacos anti-inflamatórios.



- Onze diterpenos, três naturais e oito semissintéticos, foram avaliados quanto atividade antibacteriana. **AC** foi substância com melhor atividade, mostrando os melhores resultados frente a praticamente todas as espécies bacterianas avaliadas com valores de CIM em torno de 30,45 $\mu\text{g/mL}$ (100 μM).



- Um estudo preliminar de SAR permitiu sugerir que, para a atividade citotóxica, a ausência de substituintes em C-3 e a presença de uma hidroxila em C-7 possivelmente foram os responsáveis pelos melhores resultados. Já para atividade anti-inflamatória, a presença do éster metílico em C-15 e a presença de uma hidroxila em C-3 foram relevantes. Com relação à atividade antibacteriana, possivelmente a presença de ácido carboxílico em C-15 e a ausência de substituintes em C-3 podem ser importantes para essa atividade.
- Os dados desse trabalho, apesar de bastante preliminares, mostram que os diterpenos labdanos ácidos, em especial ácido copálico e suas substâncias correlacionadas, apresentam um potencial para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, anti-inflamatórios e antibacterianos. Esses dados também apontam para a necessidade de novos estudos, como a obtenção de derivados semissintéticos com maiores modificações em C-7, além da adição de grupamentos hidrofóbicos no anel A e na cadeia lateral para avaliação das potenciais atividades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, F. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 15, p. 443, 2015.
- ABRÃO, F. et al. Antibacterial effect of *Copaifera duckei* dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.
- ARRUDA, C. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 109, n. 1, p. 1-20, 2019.
- ARNÓ, M. et al. Synthesis and cytotoxic activity of novel c7-functionalized spongiane diterpenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 3171–3177, 2003.
- BARBOSA, A. L. P. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 233, n. 1, p. 94-100, 2019.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1172-1180, 2002.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BORGES, C. H. G. et al. *Copaifera duckei* oleoresin and its main nonvolatile terpenes: *in vitro* schistosomicidal properties. **Wiley-VHCA**. v. 13, n. 10, p. 1348-1356, 2016.
- BRAHMACHARI, G. **Bioactive Natural Products - Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. 1. ed. Singapura: World Scientific, 2012.
- BREITMAIER, E. **Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- BRUNETON, J. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**. Lavoisier, 1987.
- BURQUE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. **Analgesicos antipiréticos: Farmacoterapia da gota**. In: (Ed.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill, 2006.
- CAINELLI, G.; CARDILLO, G. **Chromium Oxidations in Organic Chemistry**. v. 19. Heidelberg: Springer-Verlag, 1984.
- CASTRO, S.B.R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- α in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology and Drug Design** v. 79, n. 3, p. 347–352, 2012.

CAVALCANTI, B.C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388–392, 2006.

CAVIN, A. L. et al. Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 768-773, 2006.

CHADWICK, D. J.; GOODE, J. **Cancer and inflammation**. v. 256. London: Novartis Foundation, 2004.

CHANG, S.T. et al. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 54, n. 3, p. 241–245, 2000.

CHAVAN, M.J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M. A. Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 5, n. 1, p. 37-40, 2002.

CHENG, S.S. et al. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 10, p. 1957–1967, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A9**. 3 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.

COMELLI JUNIOR, E. et al. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oil. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 25, n. 4, p. 362-367, 2010.

CORRÊA, T.A. et al. Synthesis of 1,4-anthracene-9,10-dione derivatives and their regulation of nitric oxide, IL-1 β and TNF- α in activated RAW264.7 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 82, p. 463-467, 2013.

CUNHA, K.M.A. et al. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 320–324, 2003.

DATTA, S. et al. Paclitaxel resistance development is associated with biphasic changes in reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential and autophagy with elevated energy production capacity in lung cancer cells: A chronological study. **Tumor Biology**. v. 39, n. 2, p. 1-14, 2017.

ESTEVIÃO, L. R. M. et al. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 28, n. 12, p. 863-869, 2013.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. **International Agency for Research on Cancer - IARC CancerBase**. v. 1, n. 11, 2013.

FRANCISCO, S.G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. **Femina**, v. 33, n. 2, p. 89-93, 2005.

FONSECA, A. P. et al. *In Vitro* Antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7865-7872, 2013.

GELMINI, F. et al. 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**. v. 440, n. 1, p. 170-178, 2013.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 387-389. 2001.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. **Planta Medica**. v. 74, n. 6, p. 594-602, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

GOREN, A.C. et al. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448-453, 2011.

GRIESS, P. On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 154, n. 1, p. 667-731, 1864.

GUSHIKEN, L. F. S. et al. Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2017, n. 1, p. 1-16, 2017.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HANESSIAN, S. **Natural Products in Medicinal Chemistry**. v. 60. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.

HE, K. et al. Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides*. **Journal of Natural Products**. v. 60, n. 1, p. 38-40, 1997.

IDIPPILY, N. D. et al. Copalic acid analogs down-regulate androgen receptor and inhibit small chaperone protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2292-2295, 2017.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 130p.

INDEX KEWENSIS. **Supplement XX**. Oxford: Claredon Press, 1996.

INOUE, M.; HASEGAWA, S.; HIROSE, Y. Terpenoids from the seed of *Platycladus orientalis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1602-1604, 1985.

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

KIM, C. S.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Three new diterpenoids from the leaves of *Thuja orientalis*. **Planta Medica**, v. 78, n. 5, p. 485–487, 2012.

KIM, T. H. et al. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 760-767, 2013.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (*Ixonanthaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54–60, 2007.

LAMA, R. et al. Bioassay guided identification of small chaperone proteins α -crystallin and Hsp27 inhibitors from copaiba oil. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 65–75, 2014.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera sp.*) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643–1647, 2007.

LEITE, A.M.C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para a conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. **Acta Botânica Brasilica**, v. 7, n. 1, p. 61-94, 1993.

LI, X. et al. Antiproliferative effect of β -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 7, p. 894–904, 2005.

LI, Q.Q. et al. Antineoplastic effect of β -elemene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1018–1027, 2010.

LIN, S. J.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of isocupressic acid. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 922-926, 1998.

LIU, C. M. ZHOU, H. B.; ZHANG, W. D. Terpenoids from stems and leaves of *Cupressus gigantea*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 6, p. 0405-0410, 2010.

LIU, J. et al. β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 183:1–183:10, 2011.

- LIU, Y.; NAIR, M.G. Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 527–532, 2011.
- LIU, F. et al. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy induced apoptosis in A549 lung cancer cells. **Oncology Letters**. v. 5, n. 4, p. 1261-1265, 2013.
- LOURENÇO, A. C. S. et al. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 11, n. 4, p. 407-413, 2009.
- LUO, Y. et al. Synthesis of new ent-labdane diterpene derivatives from andrographolide and evaluation on cytotoxic activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 11, p. 2421–2424, 2015.
- MACIEL, M.A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.
- MADDISON, J.; PAGE, S.; CHURCH, D. **Small Animal Clinical Pharmacology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Ltd, 2008.
- MASSON, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.
- MASSON-MEYERS, D. et al. Topical treatment with *Copaifera langsdorffii* oleoresin improves wound healing in rats. **International Journal of Phytomedicine**. v. 5, n. 3, p. 378-386, 2013.
- MATOS, P.M. et al. New non-toxic semi-synthetic derivatives from natural diterpenes displaying anti-tuberculosis activity. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18264-18278, 2015.
- MCCHESENEY, J.D.; CLARK, A.M.; SILVEIRA, E.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderzanus*, 1-hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1625–1633, 1991.
- MCCONNELL, J. R.; MCALPINE, S. R. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, n. 7, p. 1923-1928, 2013.
- MELO, B. A. et al. Atividade inseticida do óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) sobre *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**. v. 20, n. 4, p. 419-428, 2015.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.
- MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**. v. 76, n. 1, p. 629– 636, 2005.

- MORS, W.; RIZZINI, C.T. **Useful plants of Brazil**. San Francisco: Holden-Day Inc., 1966.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- NAKANO, T.; DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI.¹ copalic acid². **The Journal of Organic Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 167–173, 1961.
- NAKAMURA, A.; NAKADA, M. Allylic Oxidations in natural product synthesis. **Synthesis**, v. 45, n. 11, p. 1421–1451, 2013.
- NETO, J. N. et al. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 20-25, 2011.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Nature Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2290-2303, 2009.
- OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.
- OMOLO, M.O. et al. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 20, p. 2797–2802, 2004.
- PAIVA, L.A.F. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.
- PAIVA, L.A.F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 2003.
- PAIVA, L. A. F. et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51–56, 2004a.
- PAIVA, L. A. F. et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, n. 1, p. 1979–1987, 2004b.
- PARK, J. W. et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 1 enhances the cytotoxic effect of retinaldehyde on A549 cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 59, p. 99382 – 99393, 2017.
- PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3. ed. Oxford: Pergamon Press, 1988.

- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- PIERI, F. A. et al. Antimicrobial activity of autoclaved and non-autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1797-1801, 2010.
- PIERI, F. A. et al. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, n. 1, p. 1929-1934, 2011.
- PIERI, F.A. et al. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241-244, 2012.
- PIERI, F.A. et al. Antimicrobial activity of *Copaifera langsdorffii* oil and evaluation of its most bioactive fraction against bacteria of dog's dental plaque. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 34, n. 2, p. 165-169, 2014.
- POPOVA, M. P. et al. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan própolis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1262-1271, 2009.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5. ed. The McGraw-Hill Companies, 2002.
- RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
- RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- ROMERO, A. L. **Contribuição ao Conhecimento Químico do Óleo-resina de Copaíba: Configuração Absoluta de Terpenos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- RODILLA, J.M. et al. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 3, p. 167-176, 2008.
- SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**. 6. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975.
- SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E. et al. Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has relaxing effect in guinea pig tracheal smooth muscle. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, n. 10-11, p. 800-807, 2008.
- SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008a.
- SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008b.

- SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SARTORELLI, P. et al. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. **Planta Medica**, v. 76, n. 13, p. 1454–1456, 2010.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**. v. 15, n. 6, p. 252-259, 2007.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v. 8, n. 1, p. 58, 2006.
- SHEN, F. et al. Dynasore suppresses proliferation and induces apoptosis of the non-small cell lung cancer cell line A549. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 495, n. 1, p. 1158-1166, 2018.
- SILVA, A.N. et al. Antitubercular activity increase in labdane diterpenes from *Copaifera* oleoresin through structural modification. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1-7, 2017.
- SILVA, M. T. da. **Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.
- SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, n. 1, p. 180–188, 2007.
- SILVA, J. J. L. et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. **Aesthetic Plastic Surgery**. v. 33, n. 1, p. 104–109, 2009.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.
- SOUZA, A.B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 215–220, 2011a.
- SOUZA, A.B. et al. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9619, 2011b.
- SOUZA, P. A. et al. Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 6, p. 539–543, 2010.
- STEPHENSON, L. M.; SPETH, D. R. Mechanism of allylic hydroxylation by selenium dioxide. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 44, n. 25, p. 4683-4689, 1979.

TANAKA R. et al. Cancer chemopreventive agents, labdane diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii* (Gord.) Carr. **Cancer Letters**, v. 161, n. 2, p. 165-170, 2000.

TAYAL, V.; KALRA, B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, n. 3, p. 1-12, 2008.

TAO, L. et al. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 24–34. 2006.

TINCUSI, B.M. et al. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 808-812, 2002.

TIRAPELLI, C.R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2, p. 233–241, 2004.

TOJO, G; FERNÁNDEZ, M. **Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones**. New York: Springer Science + Business Media, 2006.

TUNG, Y.T. et al. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous *Cinnamon* (*Cinnamomun osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3908–3913, 2008.

VALDEVITE, L. M. **Estudo do efeito in vitro do extrato das folhas e do óleorresina de copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans* relacionados à cárie dental**. 2007. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

VARGAS, F. de S. et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera spp.* oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015.

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

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. 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**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Authenticity control of commercial copaiba oils by high resolution gas chromatography. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612–615, 1997.

VIDYASAGAR, A.; WILSON, N. A.; DJAMALI, A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. **Fibrogenesis Tissue Repair**. v. 5, n. 1, p. 1-7, 2012.

VIEIRA, H.S. et al. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 151–157, 2002.

VIEIRA, R. C. et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 8, p. 358-366, 2008.

WANG, G. et al. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 7, p. 881–893, 2005.

WANG, Z. **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

WANG, L. et al. Establishment of a first-line second-line treatment model for human pulmonary adenocarcinoma. **Oncology Letters**. v. 12, n. 6, 2016.

WERMUTH, C. G. et al. **The practice of Medicinal chemistry**. 4. ed. Illkirch: Elsevier, 2015.

WOOD, G. et al. **The dispensatory of the United States of America**. 22. ed. Londres: J.B. Lippincott Company, 1940.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2019.

WU, D. et al. Pemetrexed induces G1 phase arrest and apoptosis through inhibiting akt activation in human non small lung cancer cell line A549. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 16, n. 4, p. 1507-1513, 2015.

WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W. **Greene's Protecti Groups in Organic Synthesis**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.

XAVIER-JUNIOR, F. H. et al. Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. **Journal of Chromatographic Science**. v. 55, n. 10, p. 1-10, 2017.

XIE, L. et al. Anti-tumor effects and mechanism of GA-13315, a novel gibberellin derivative, in human lung adenocarcinoma: an *in vitro* and *in vivo* study. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v. 24, n. 6, p. 1-12, 2019.

YOUNES, R. N. et al. Chemotherapy beyond first-line in stage IV metastatic non-small cell lung cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 57, n. 6, p. 686-691, 2011.

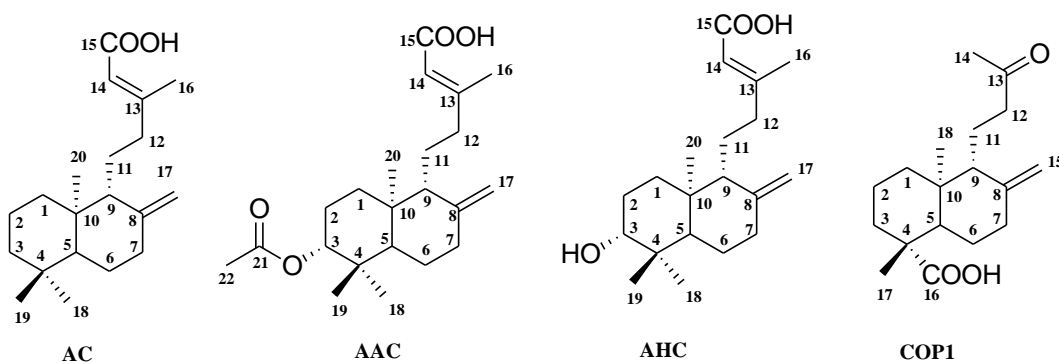
ZHANG, Q. et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin a enhances antitumor effects of docetaxel or erlotinib in A549 cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 13, n. 7, p. 3471-3476, 2012.

ZHAO, Y.S. et al. β -elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 107, n. 2, p. 307–314, 2011.

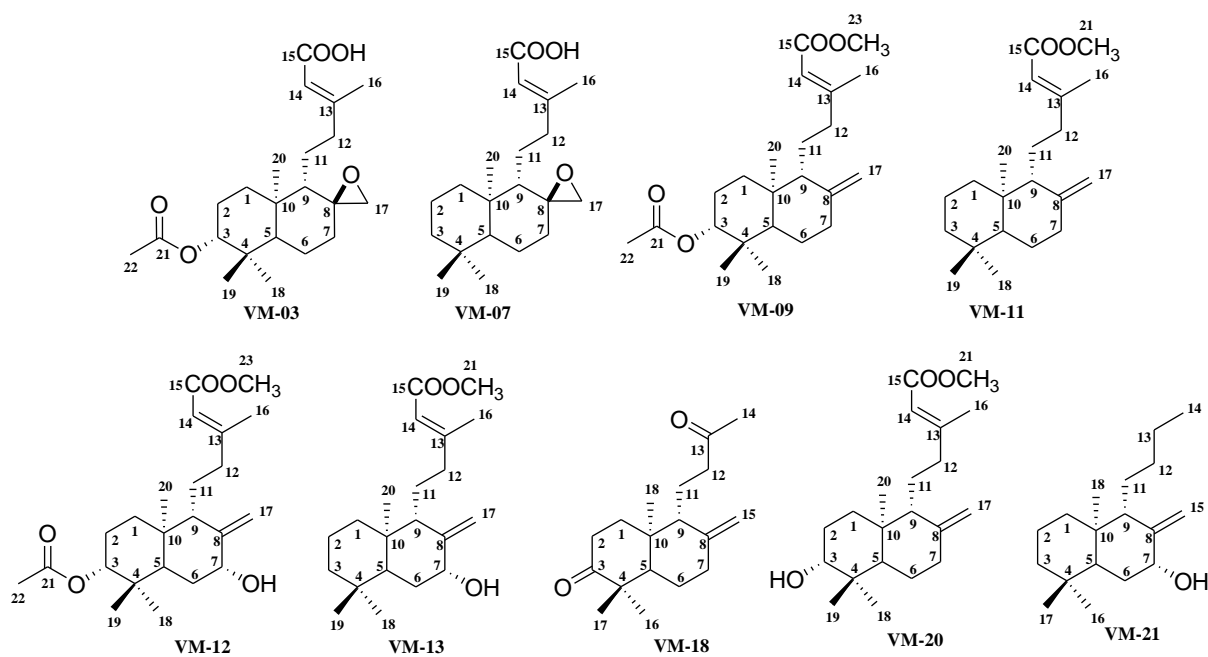
ZIMMERMAM-FRANCO, D. C. et al. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**. v. 18, n. 10, p. 12561-12570, 2013.

ZOU, L.; LIU, W.; YU, L. β -elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 23, n. 3, p. 196–198, 2001.

APÊNDICE 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DITERPENOS NATURAIS

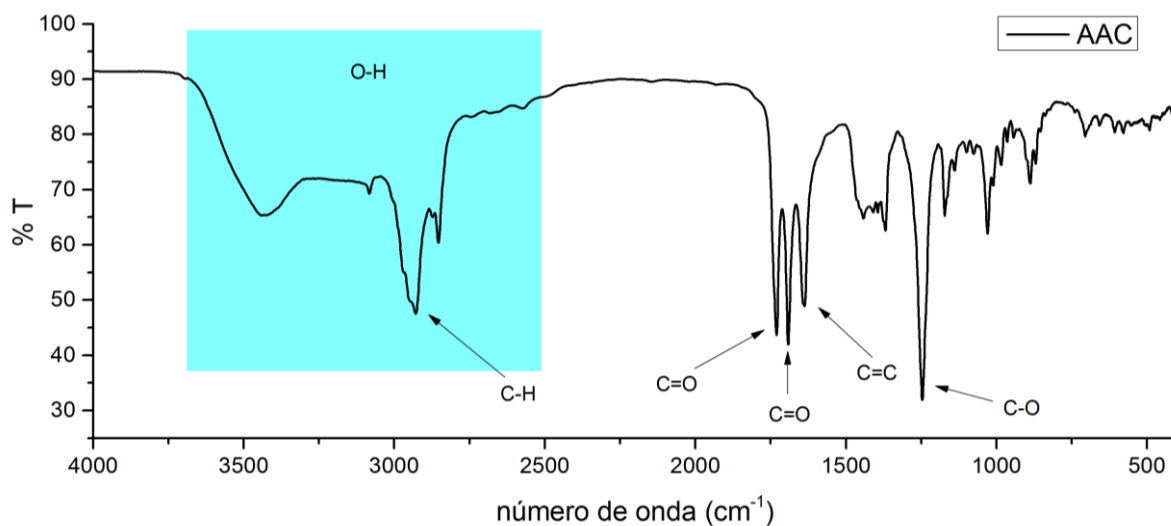


APÊNDICE 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS DITERPENOS SEMISSINTÉTICOS

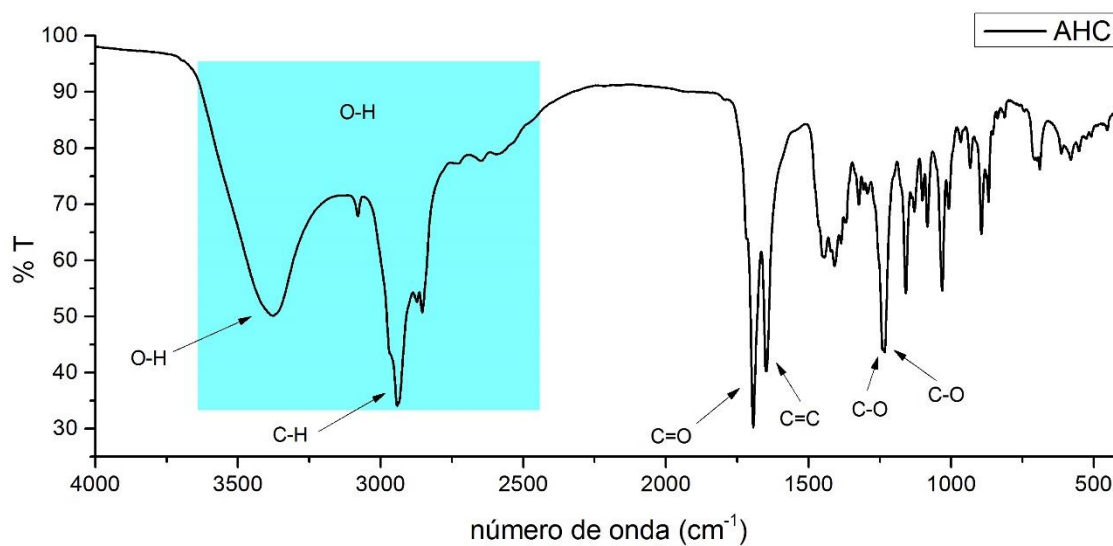


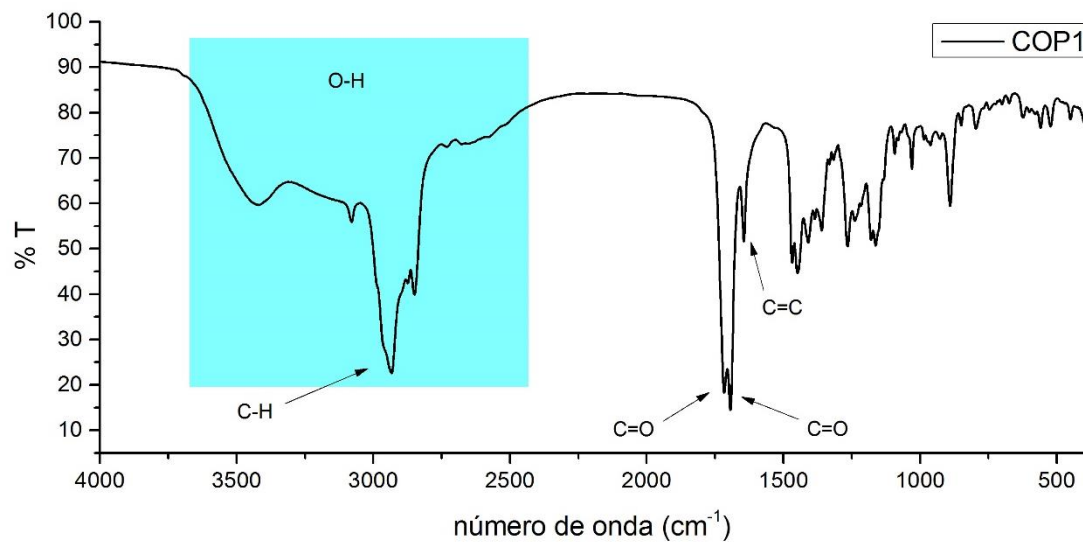
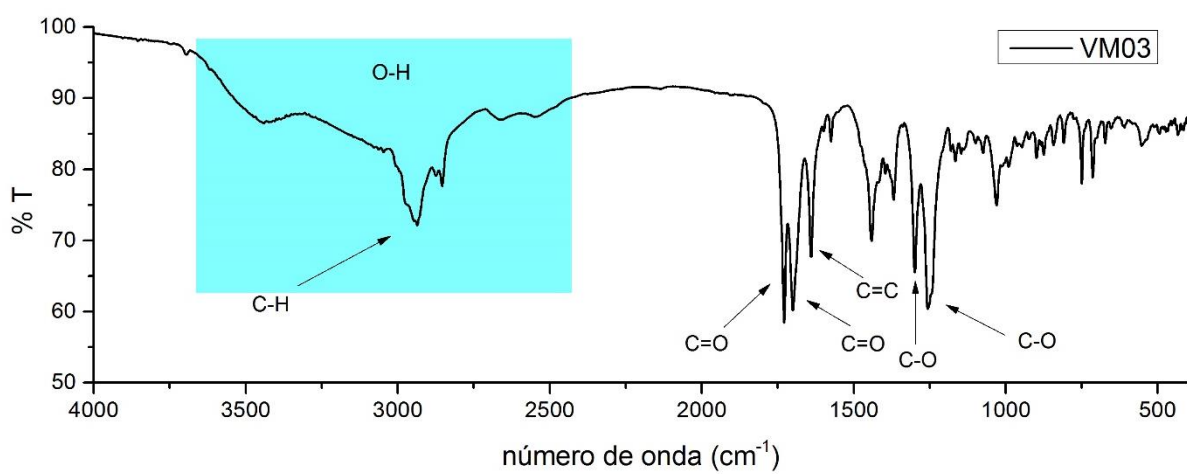
APÊNDICE 3 – ESPECTROS INFRAVERMELHO

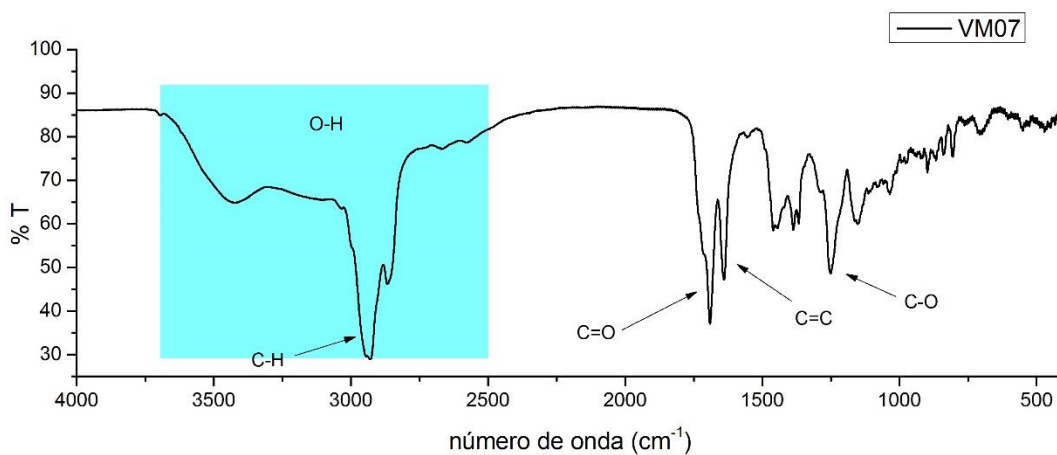
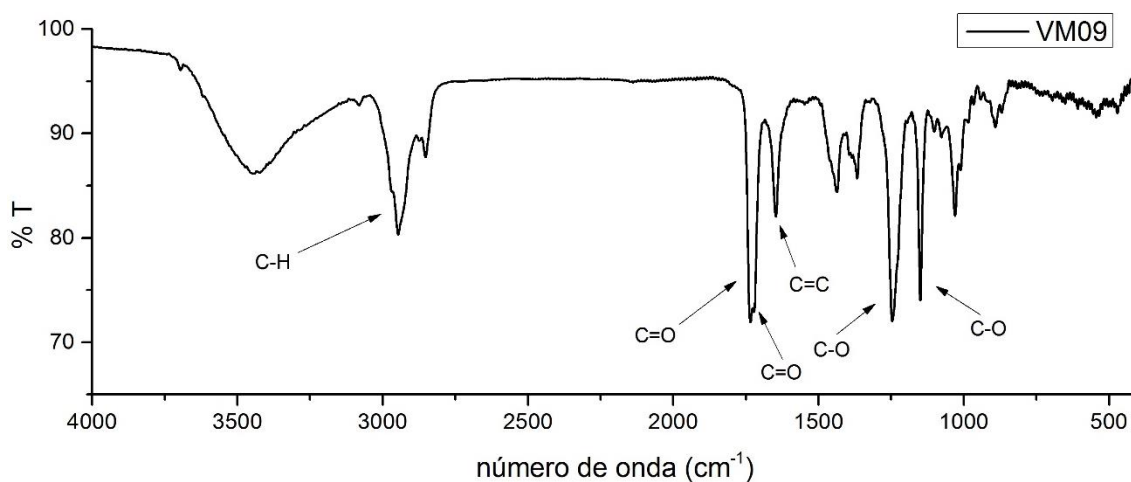
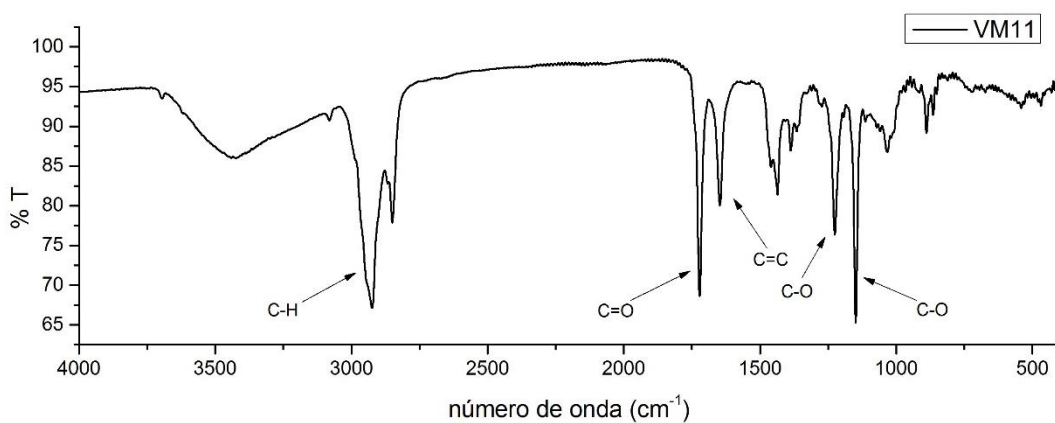
Espectro no infravermelho (KBr) de AAC.

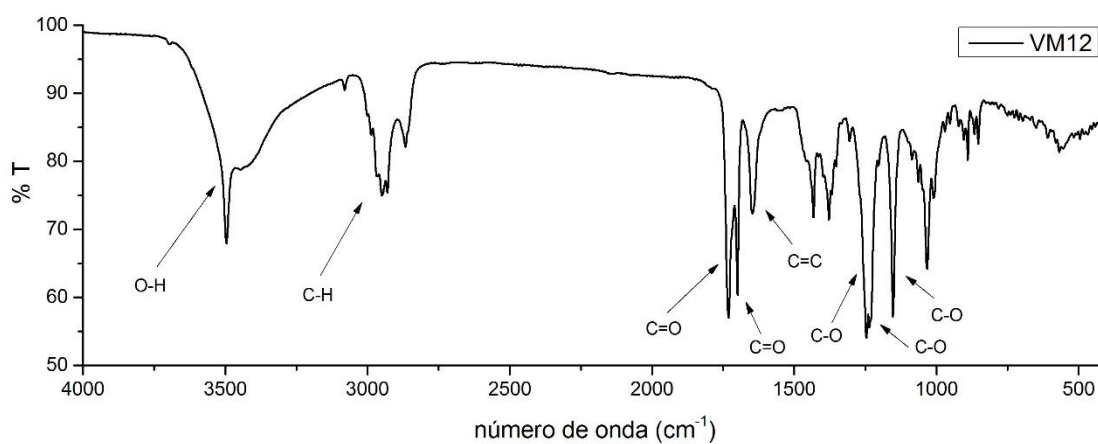
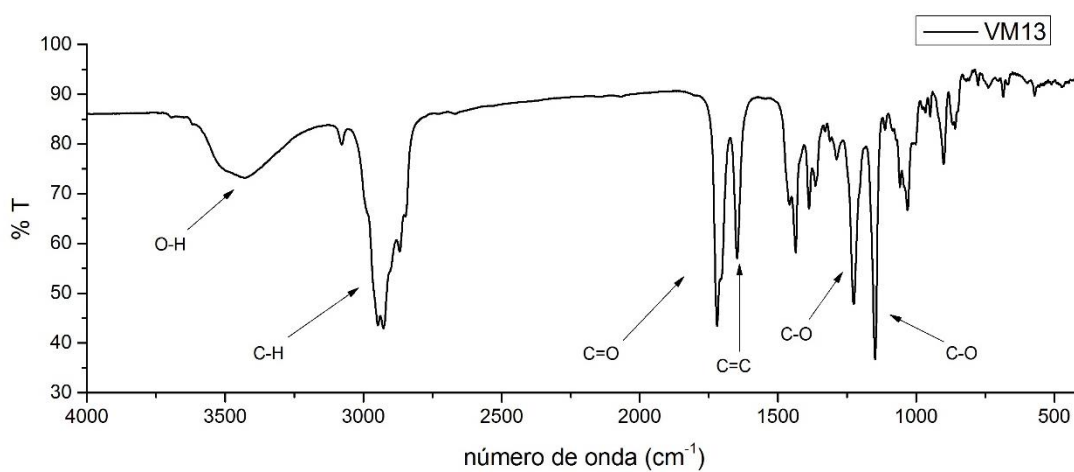
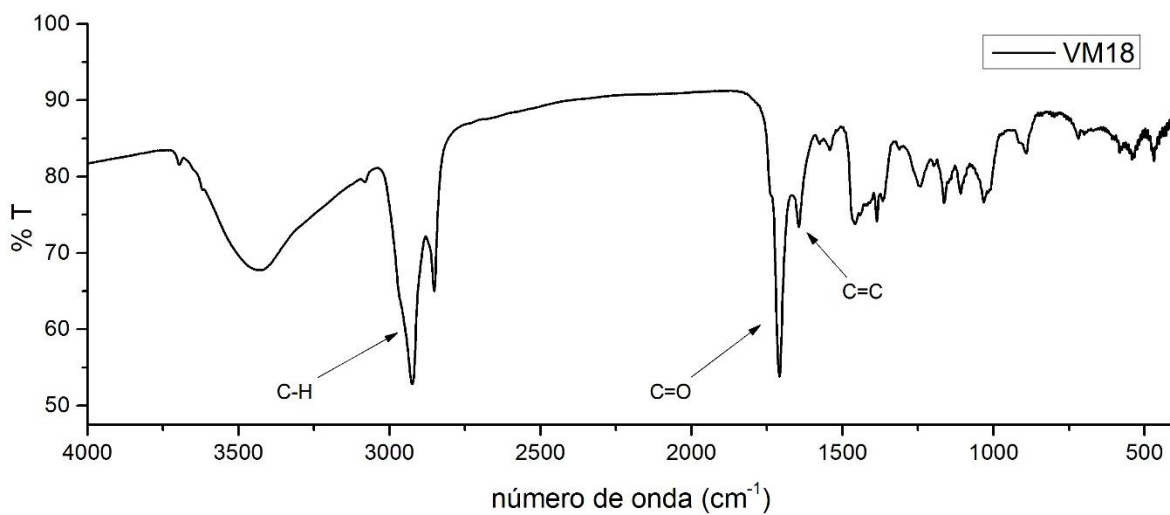


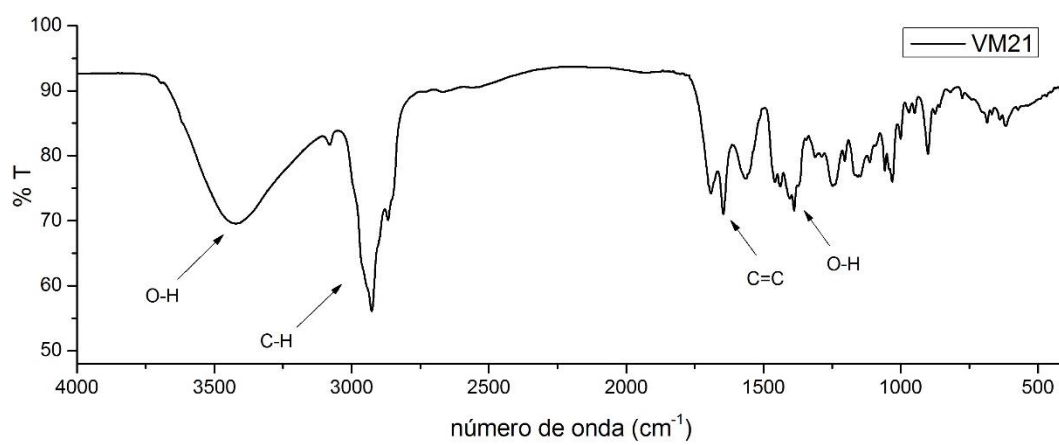
Espectro no infravermelho (KBr) de AHC.



Espectro no infravermelho (KBr) de **COP1**.Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-03**.

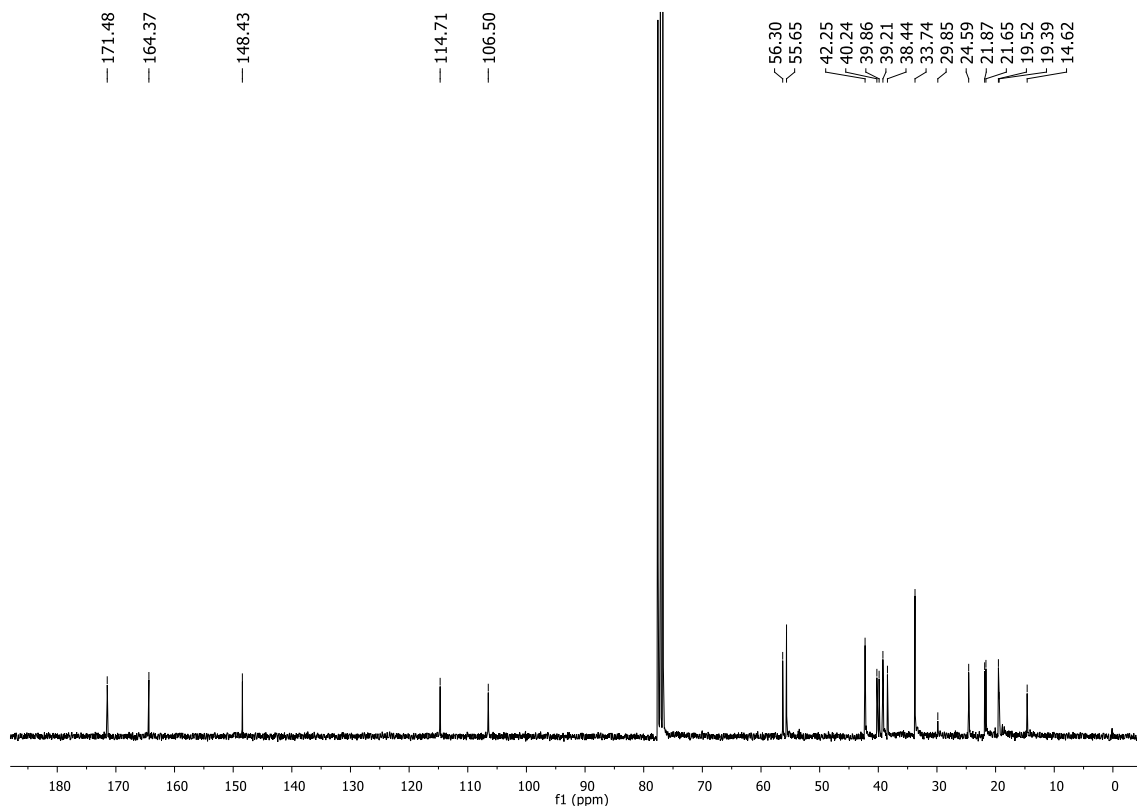
Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-07**.Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-09**.Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-11**.

Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-12**Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-13.**Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-18**

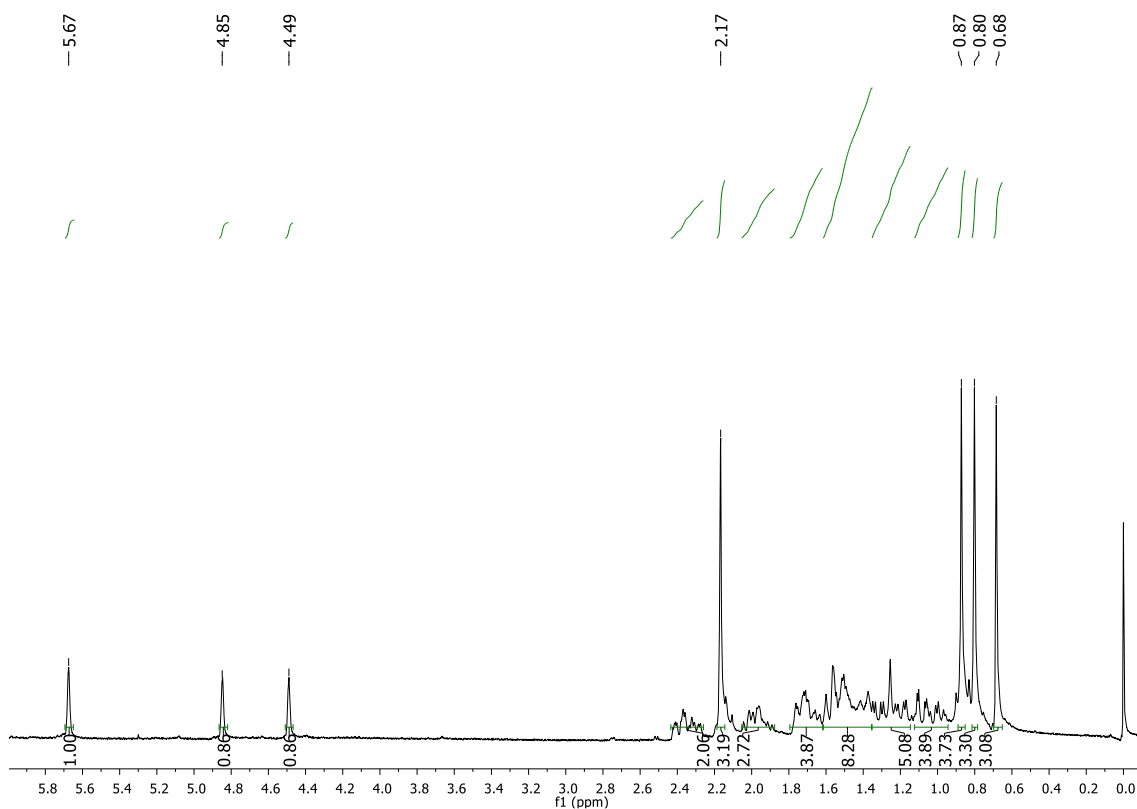
Espectro no infravermelho (KBr) de **VM-21**

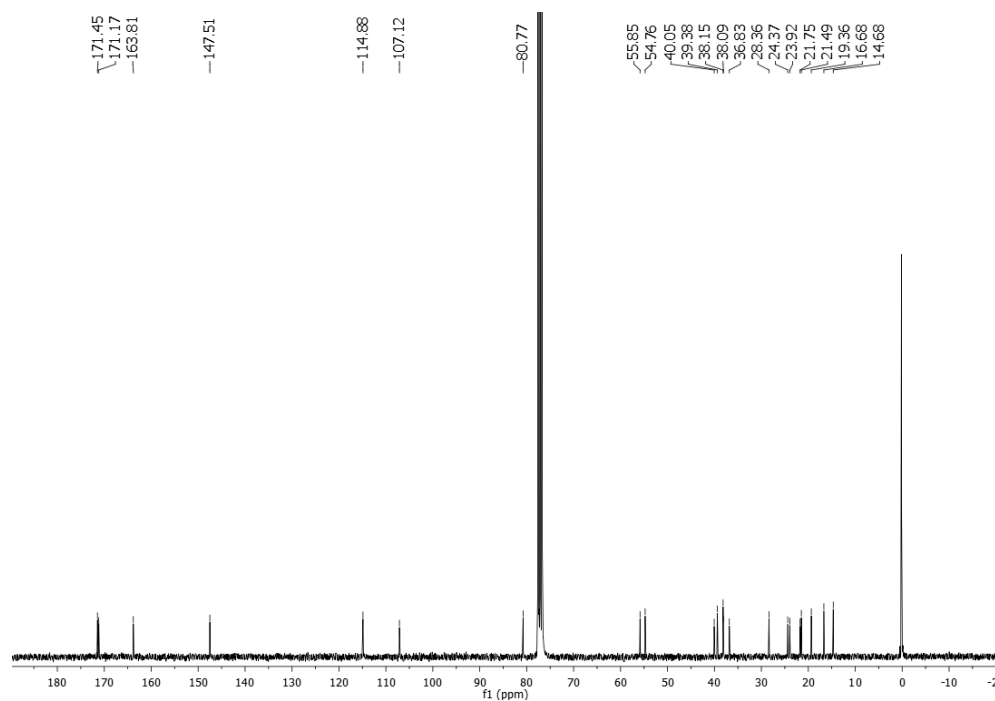
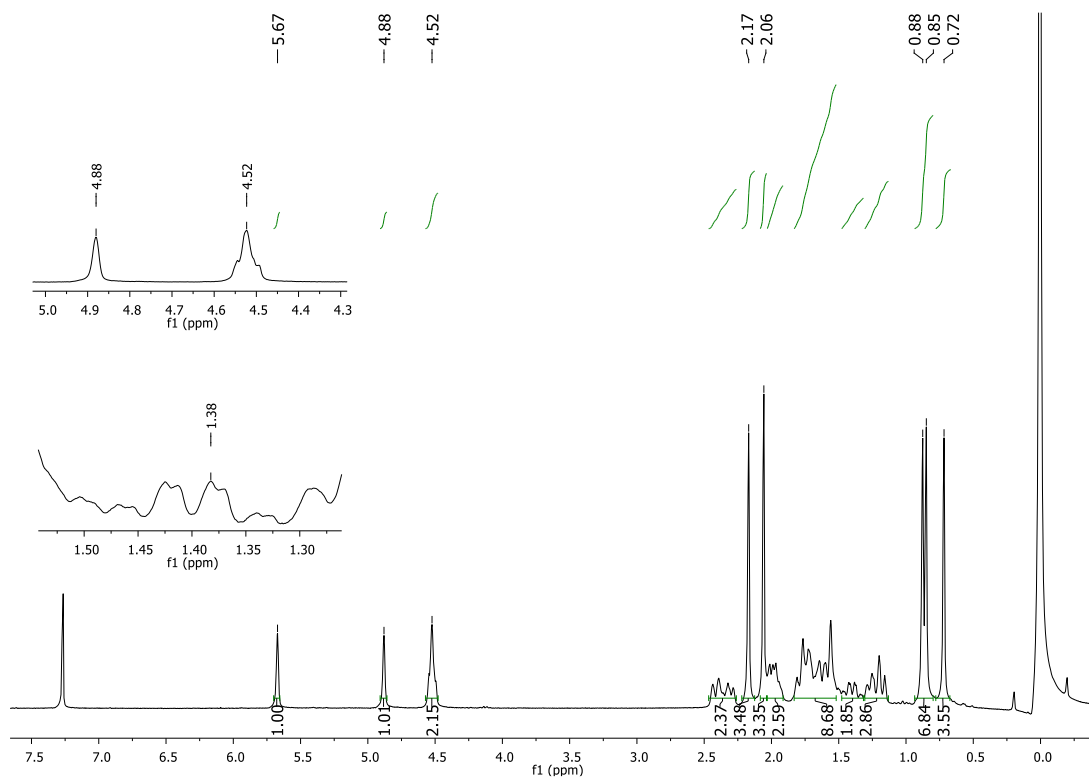
APÊNDICE 4 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C

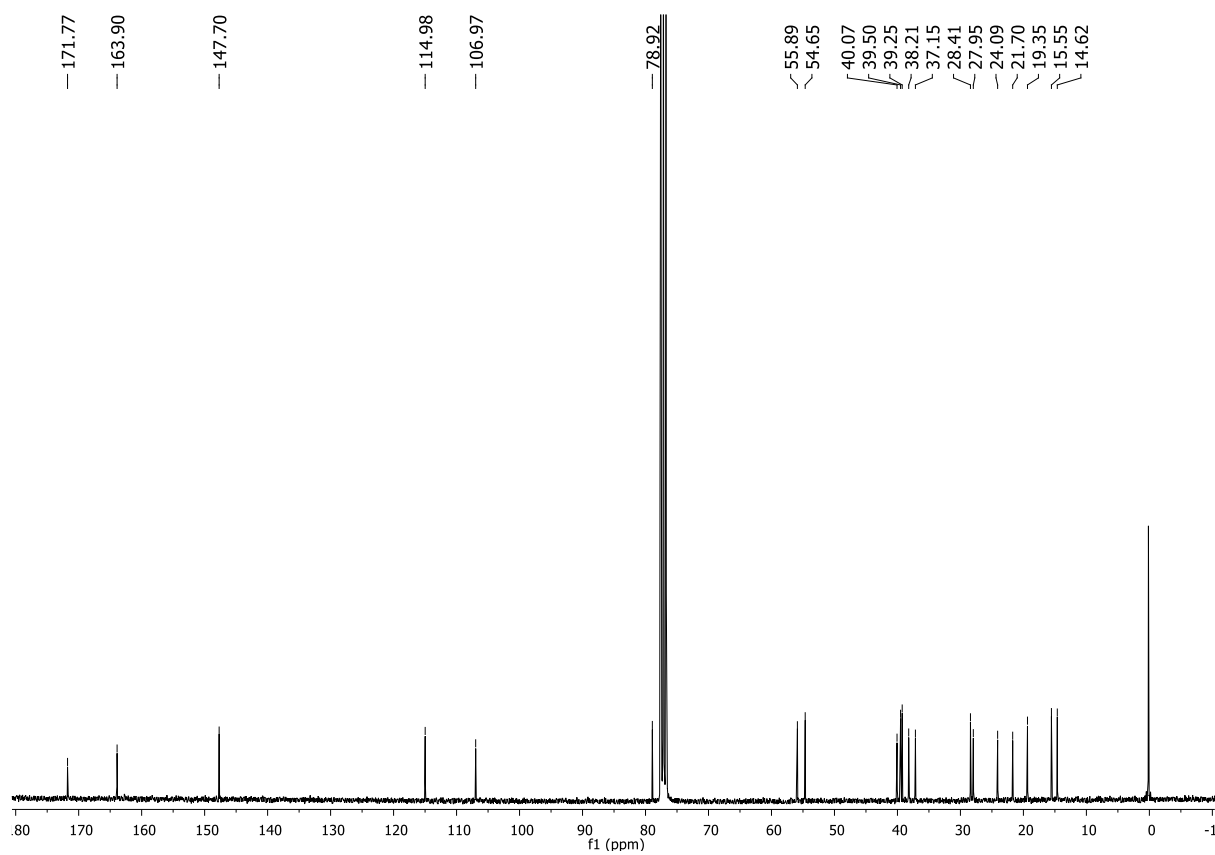
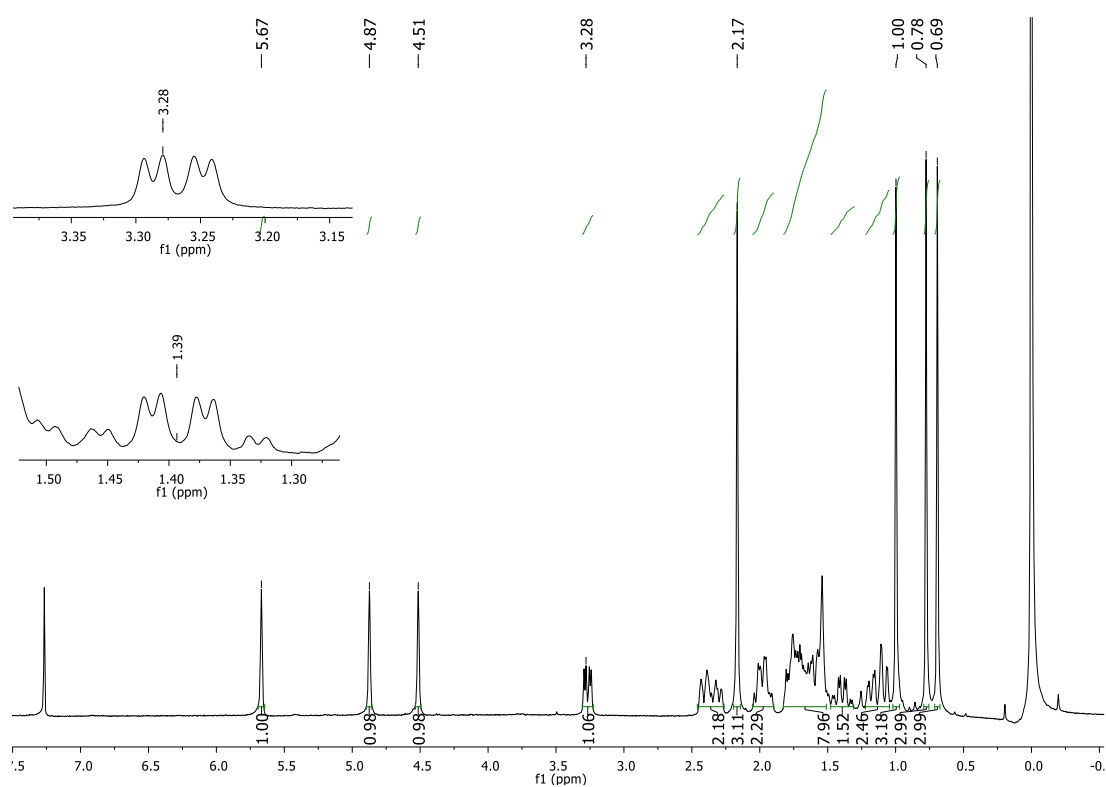
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de AC.

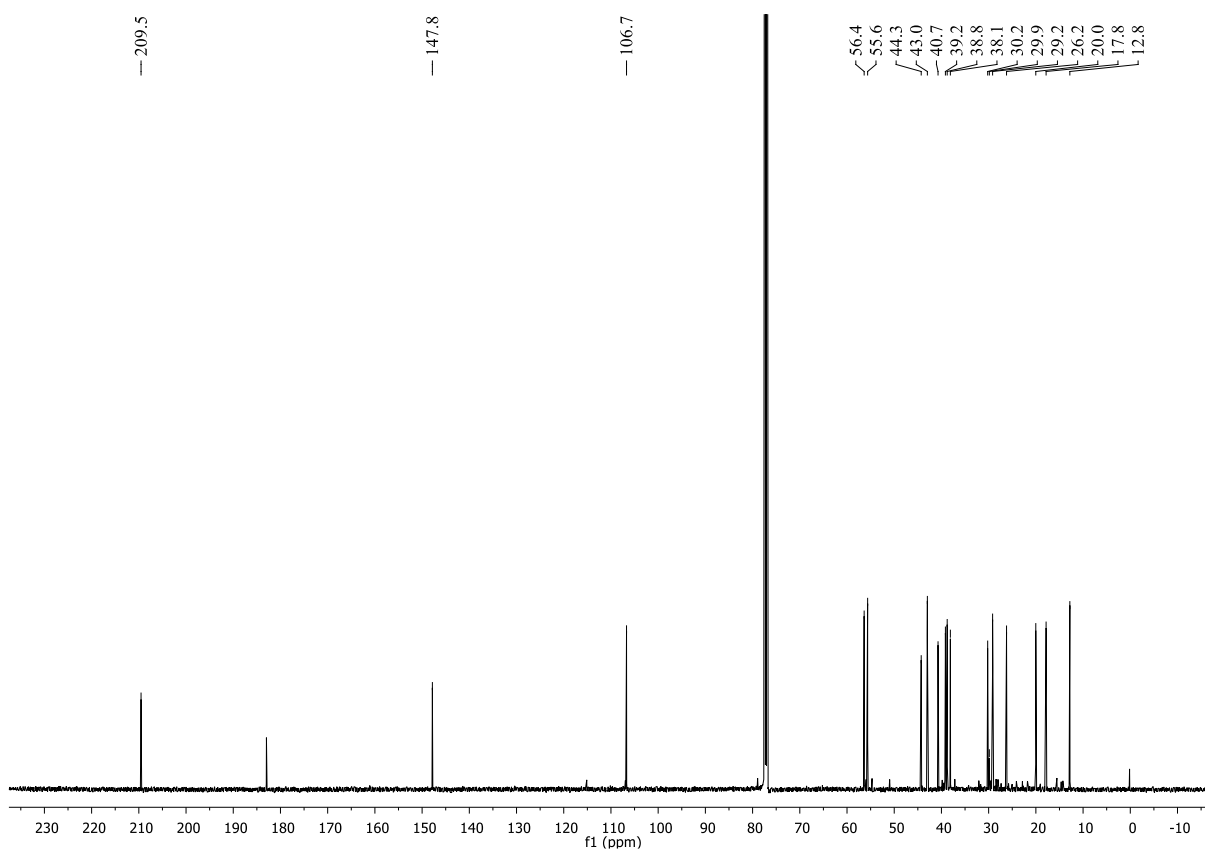
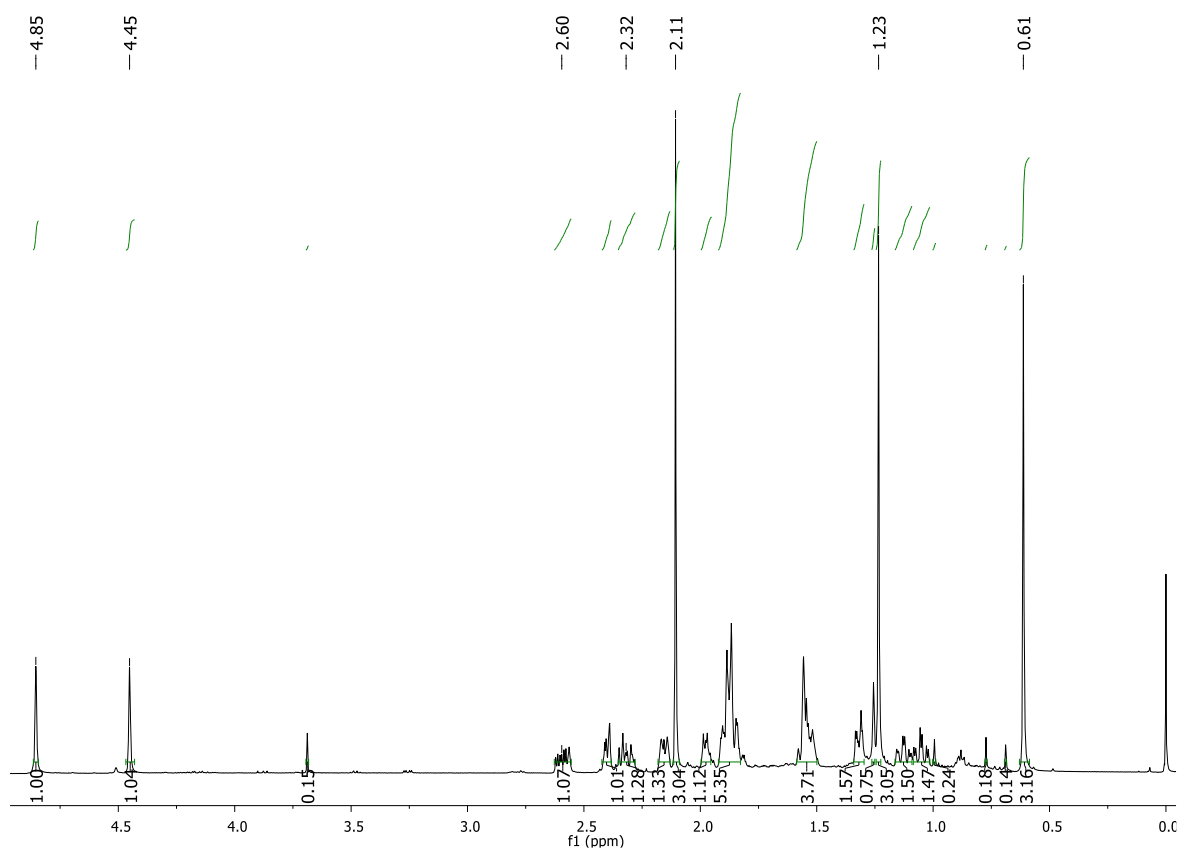


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AC.



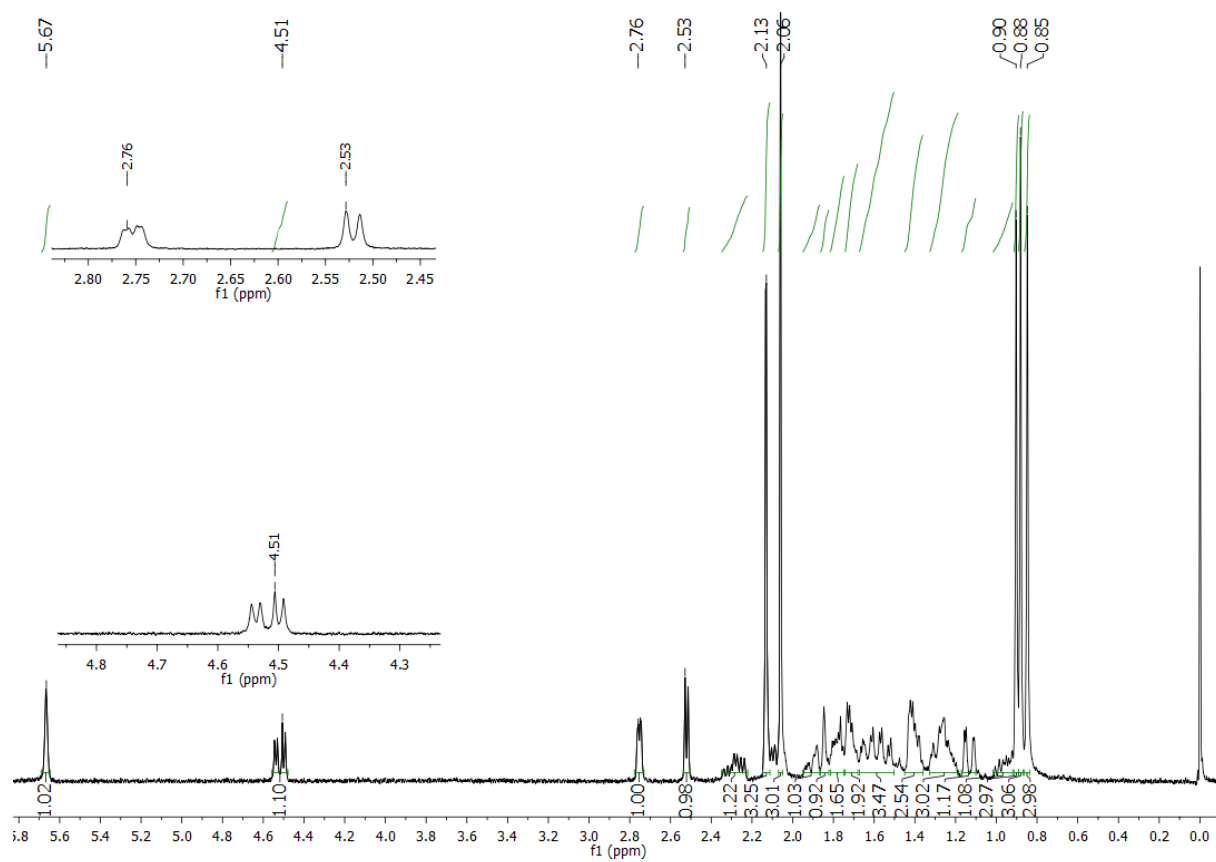
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de AAC.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AAC, com destaque para H-17, H-3 e H-6.

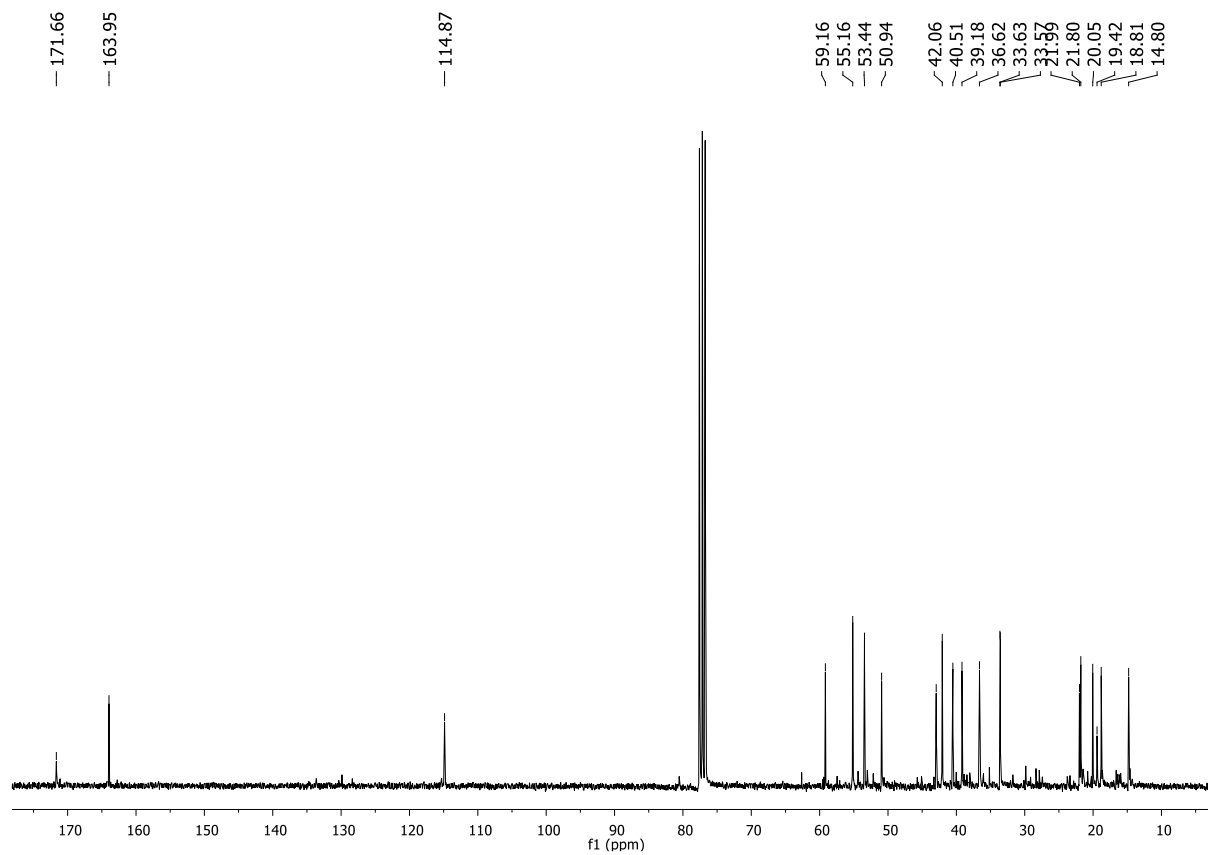
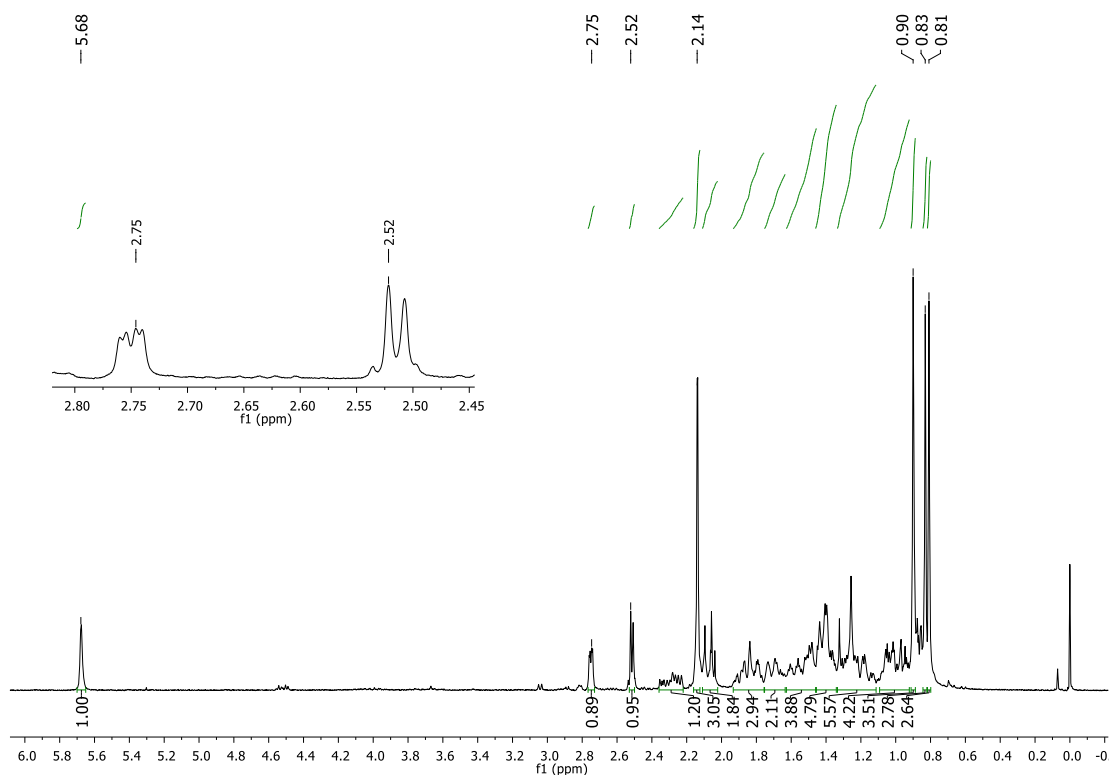
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **AHC**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **AHC**, com destaque para H-3 e H-6.

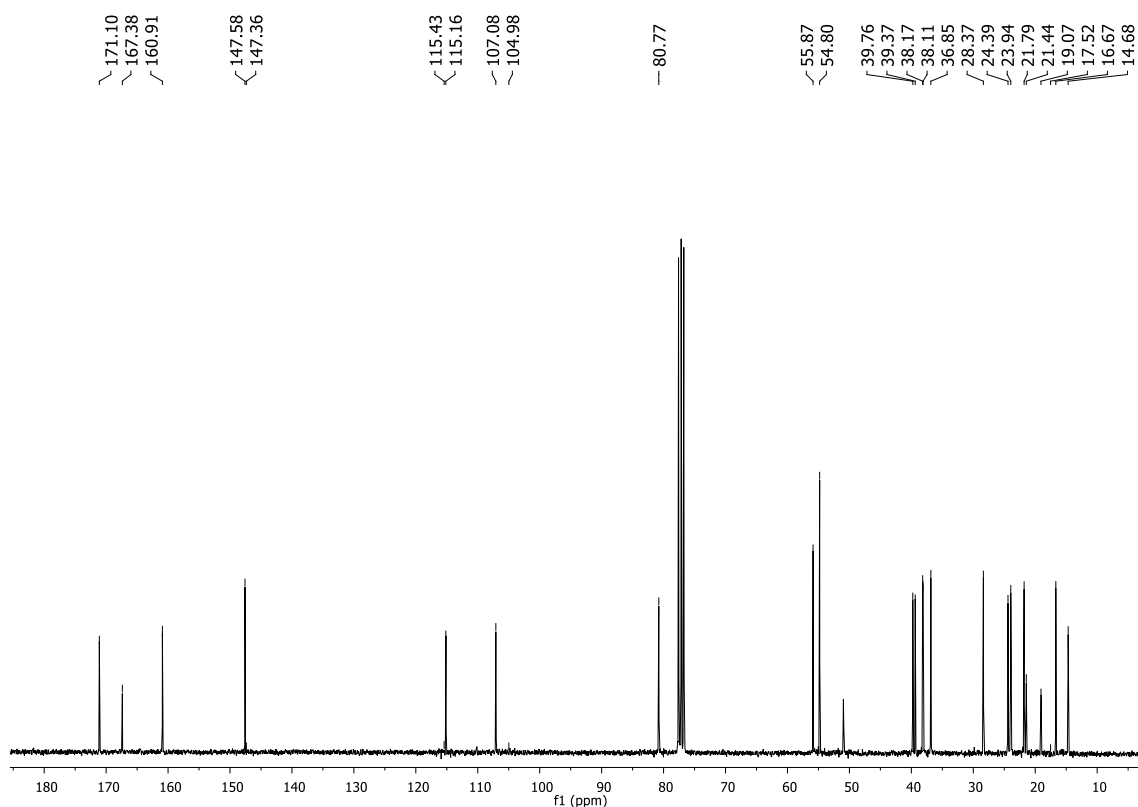
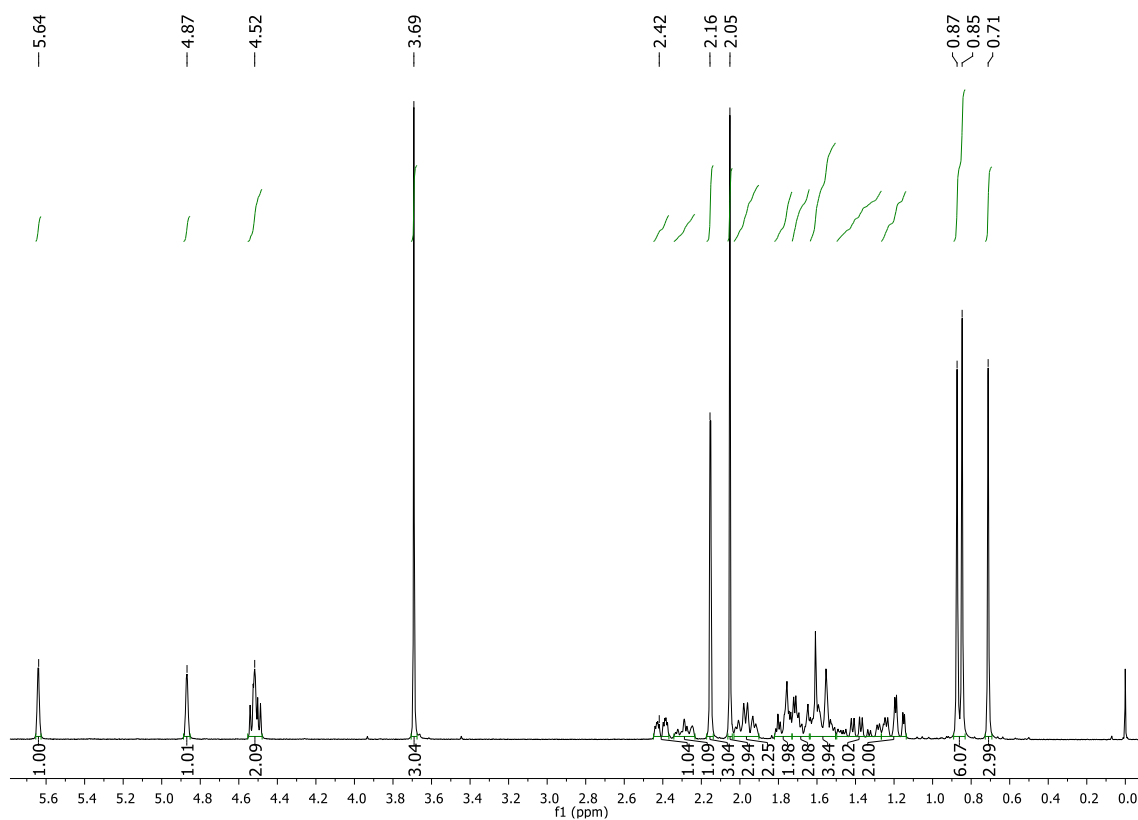
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **COP1**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **COP1**.

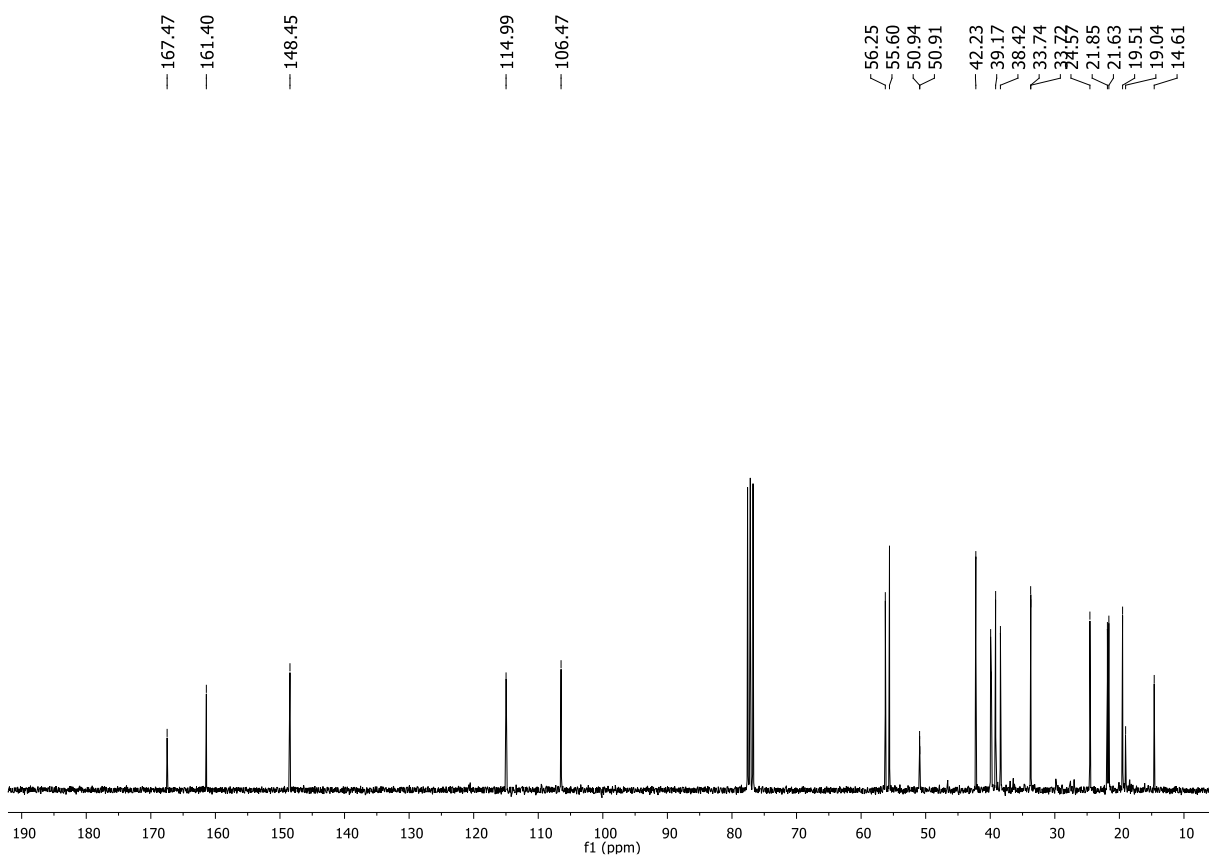
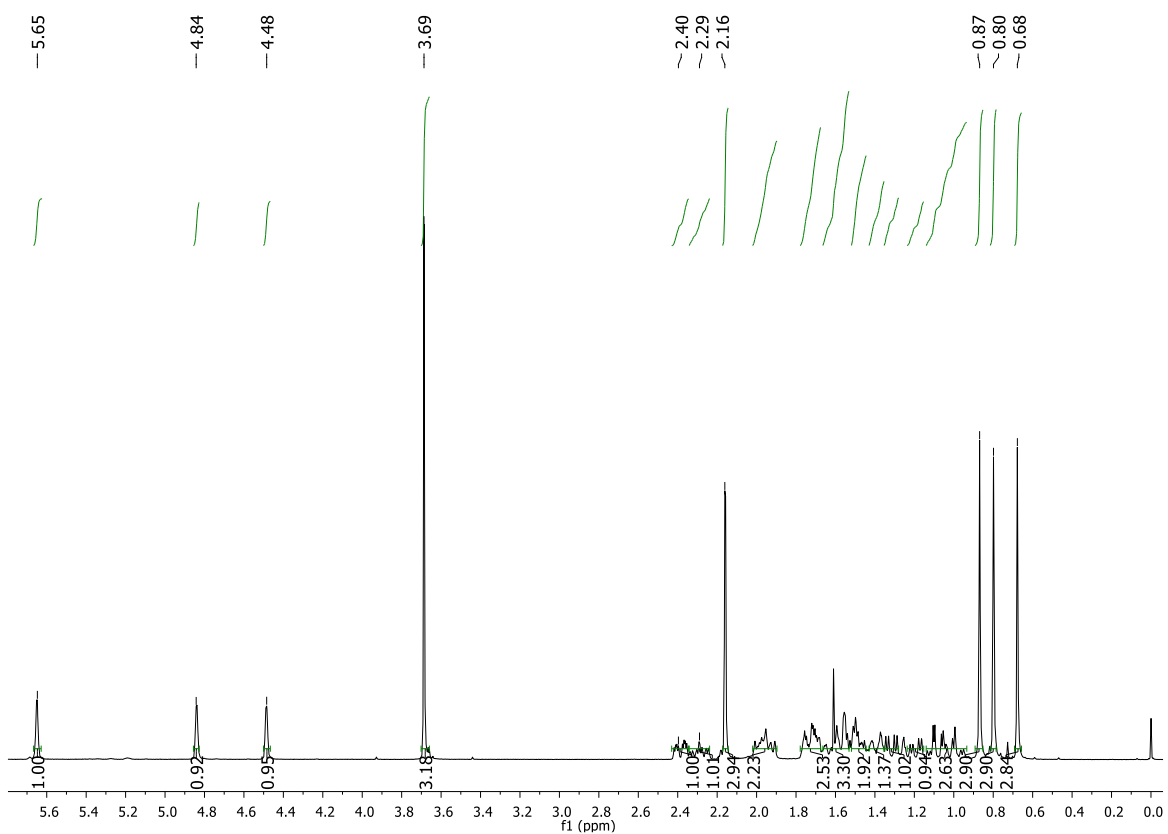
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-03**, com destaque para H-17 e H-

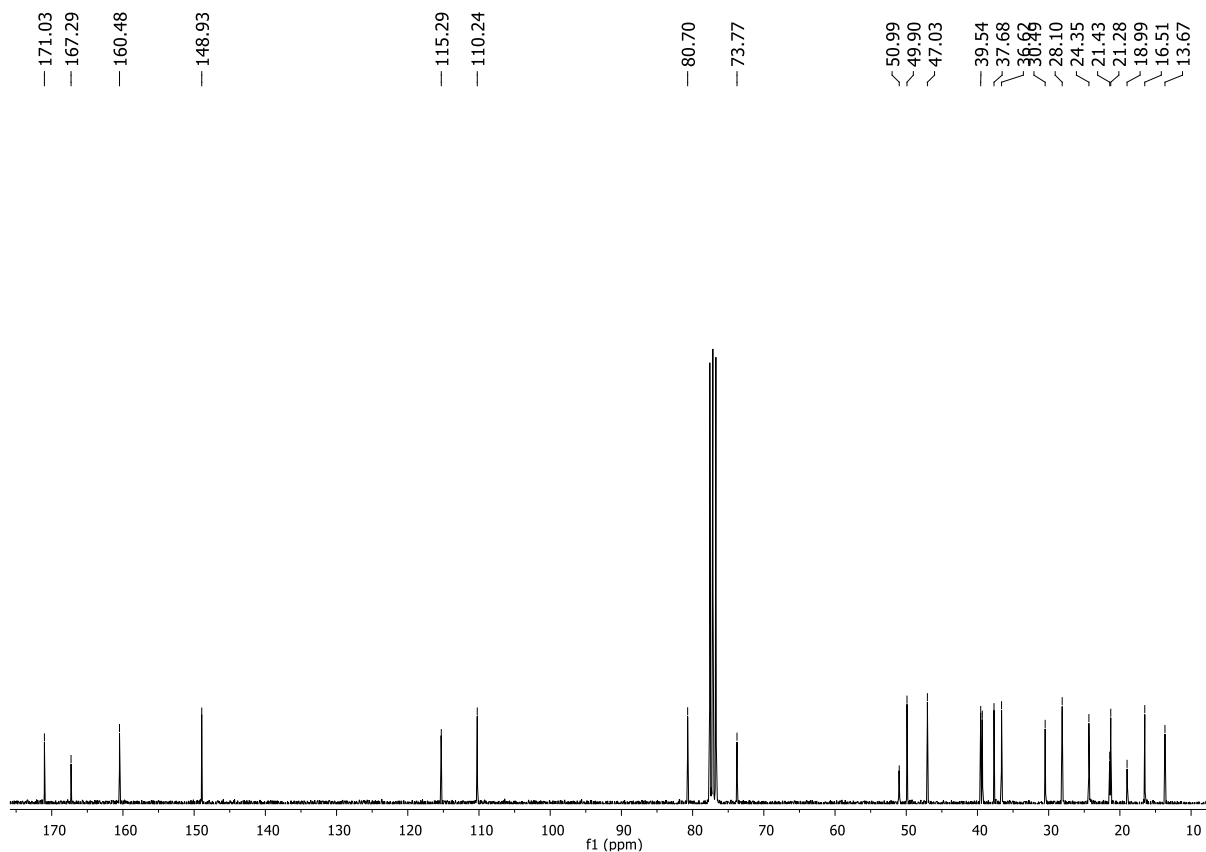
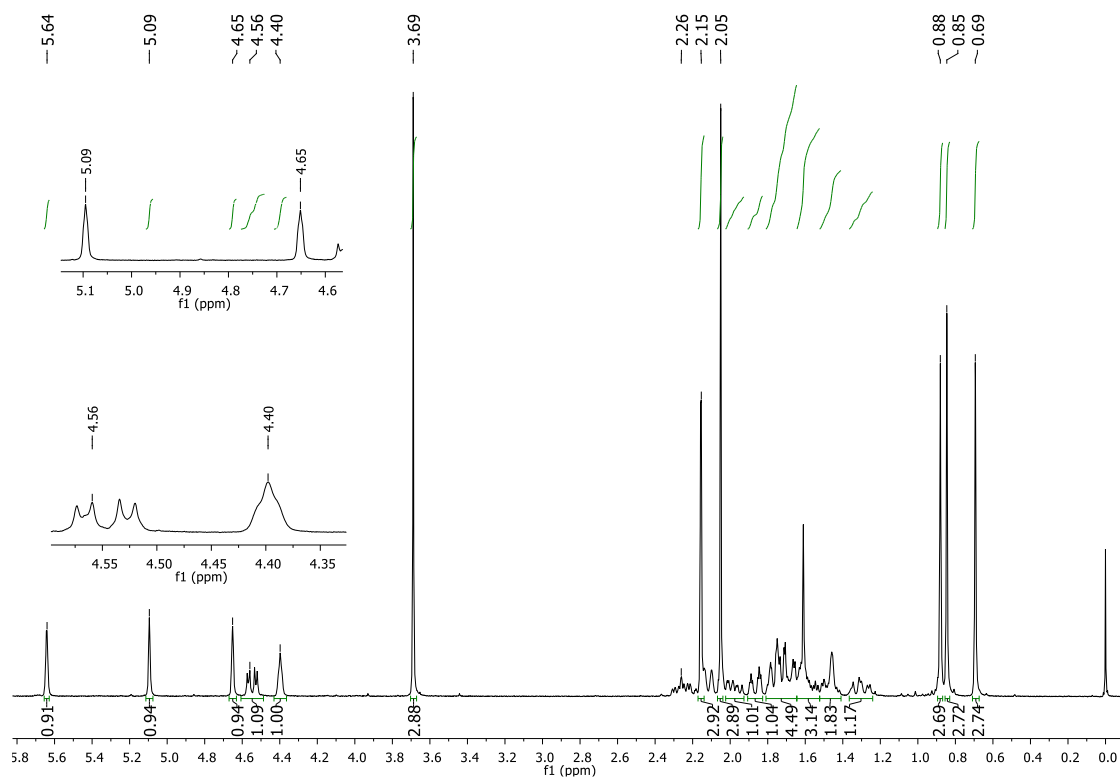
3.

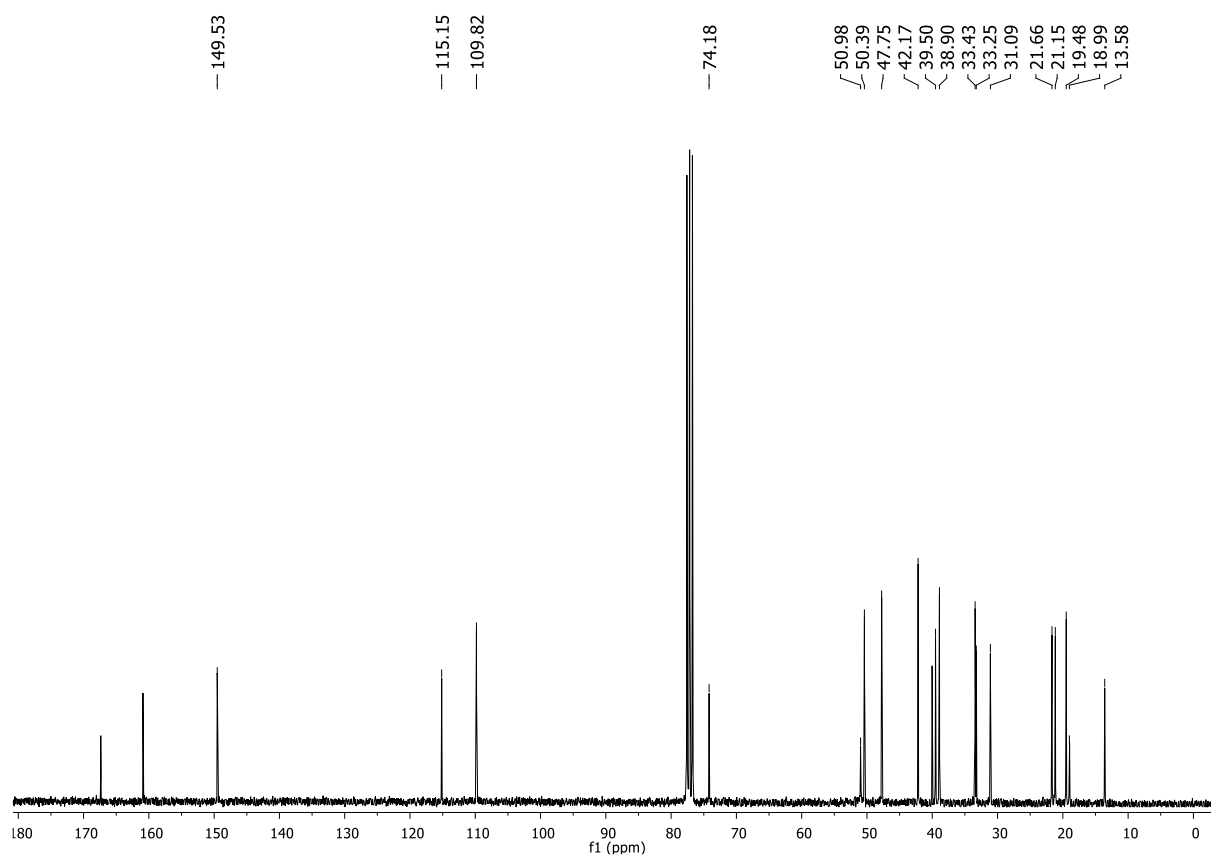
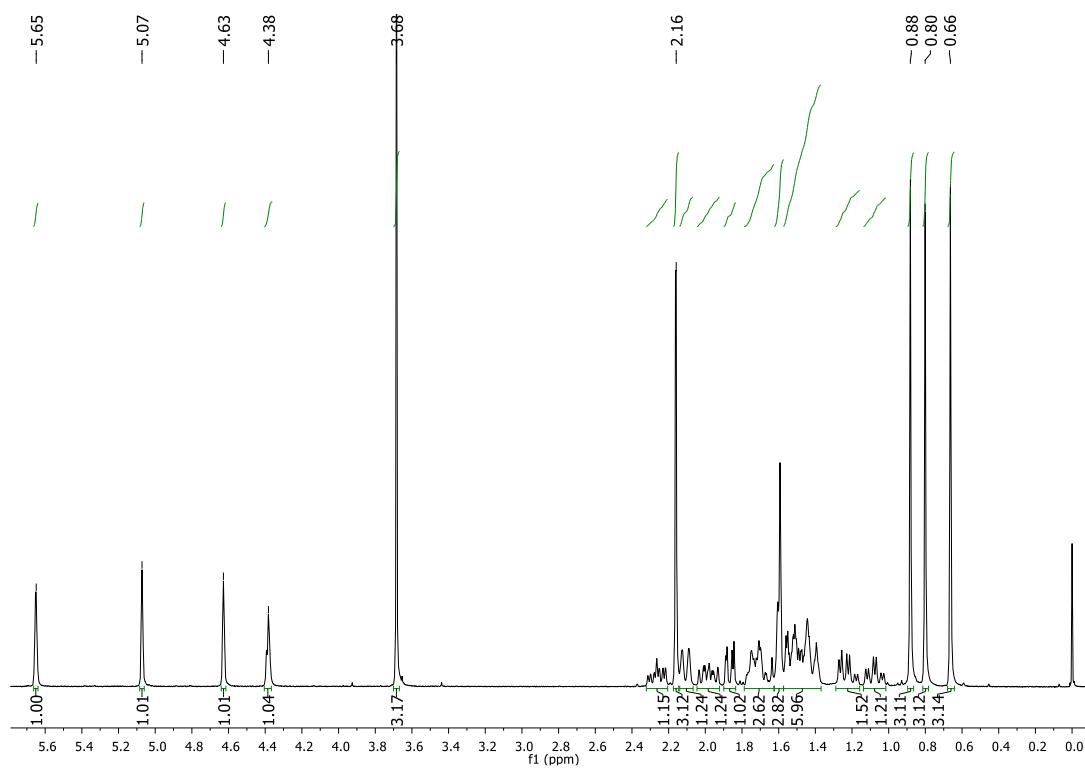


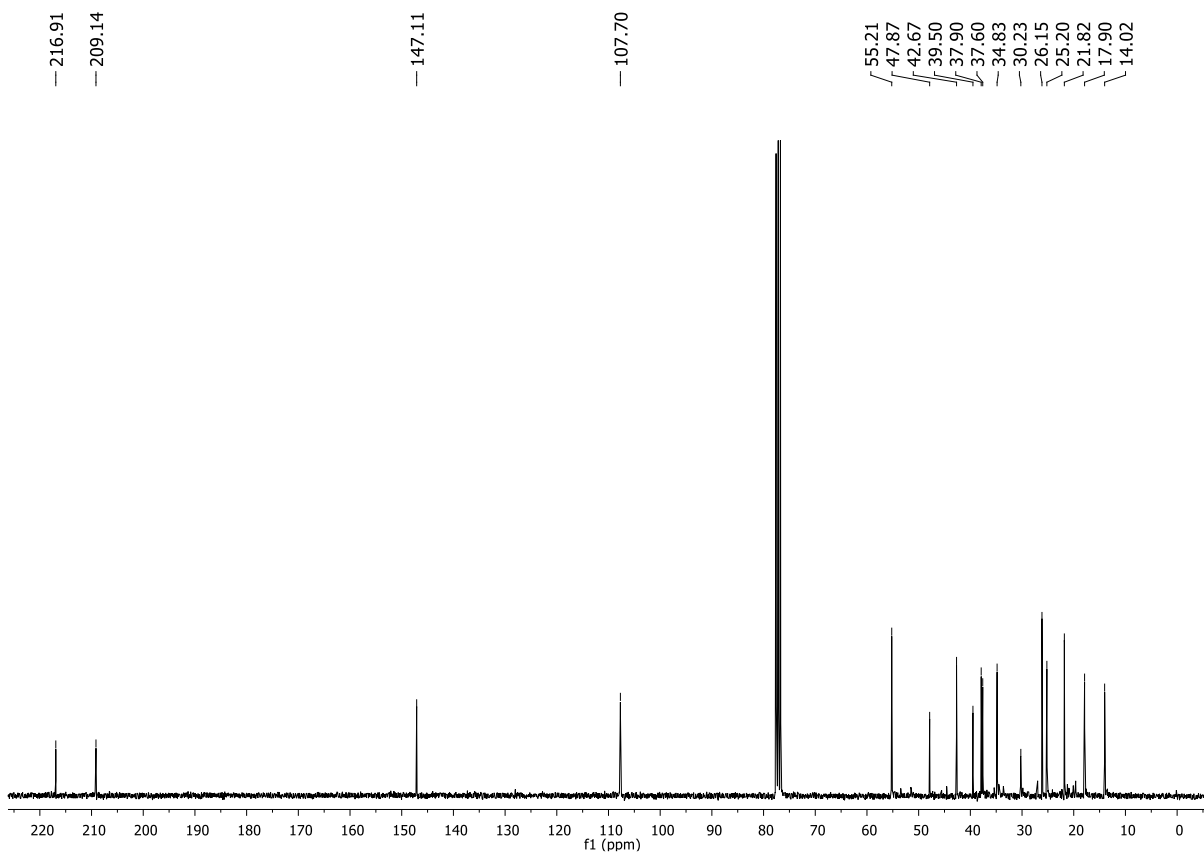
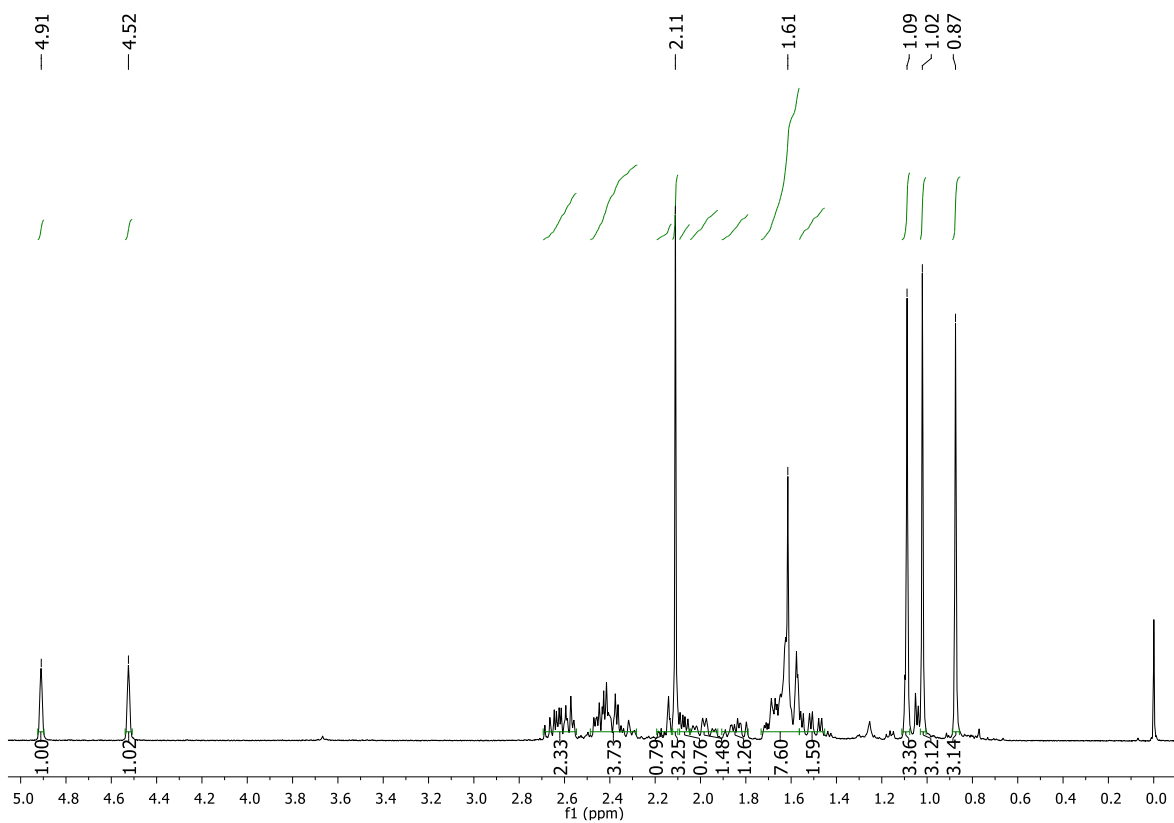
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-07**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-07**, com destaque para os sinais referentes a H-17

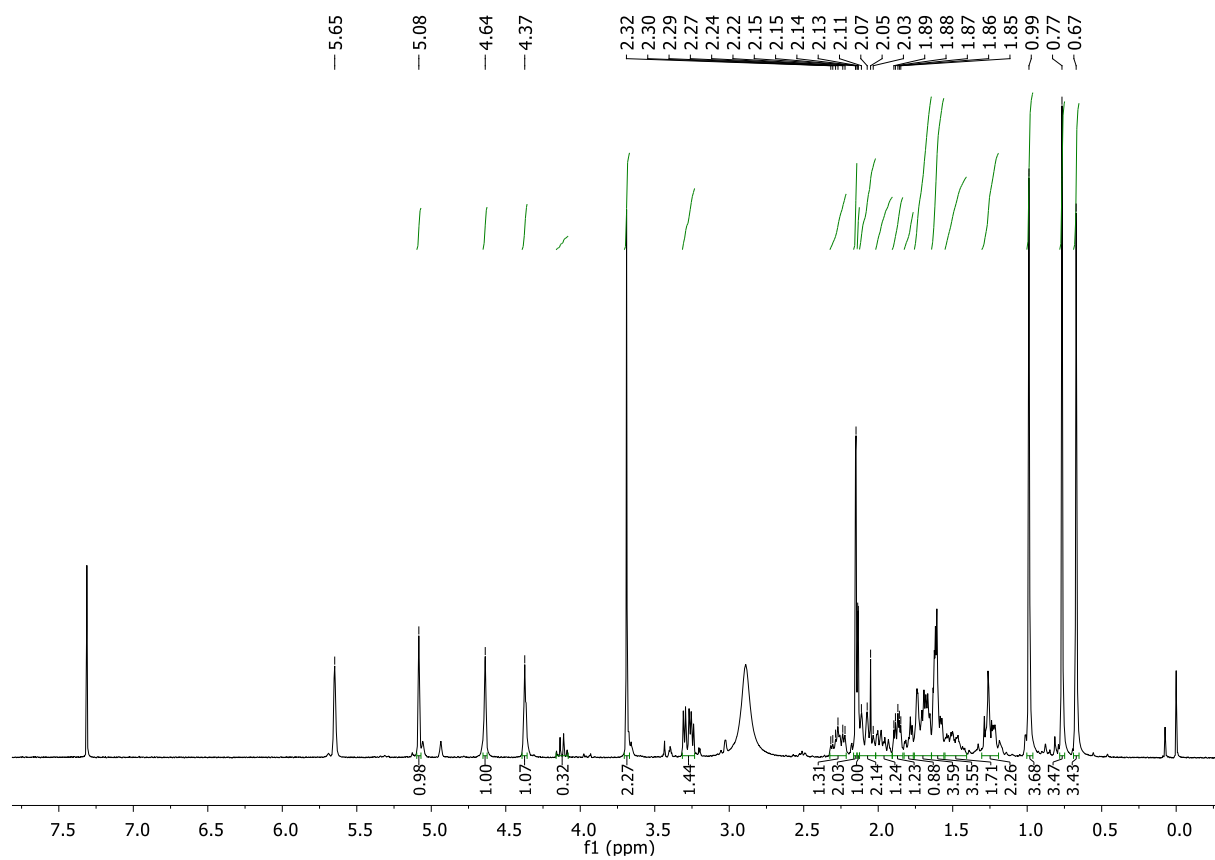
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-09**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-09**.

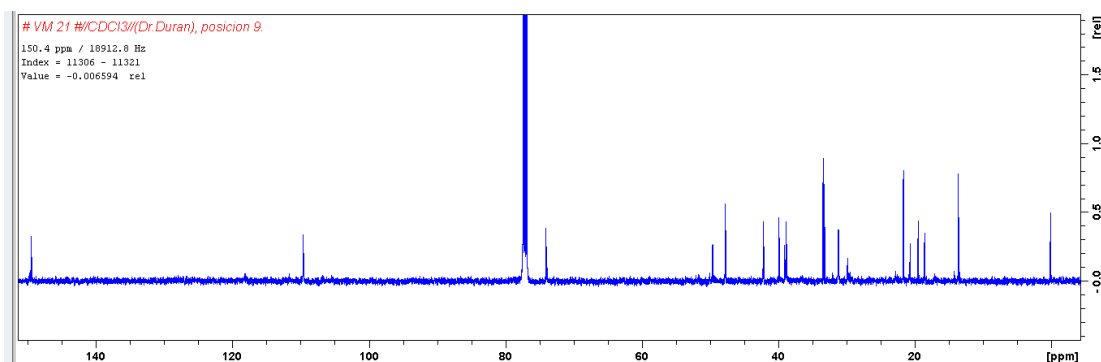
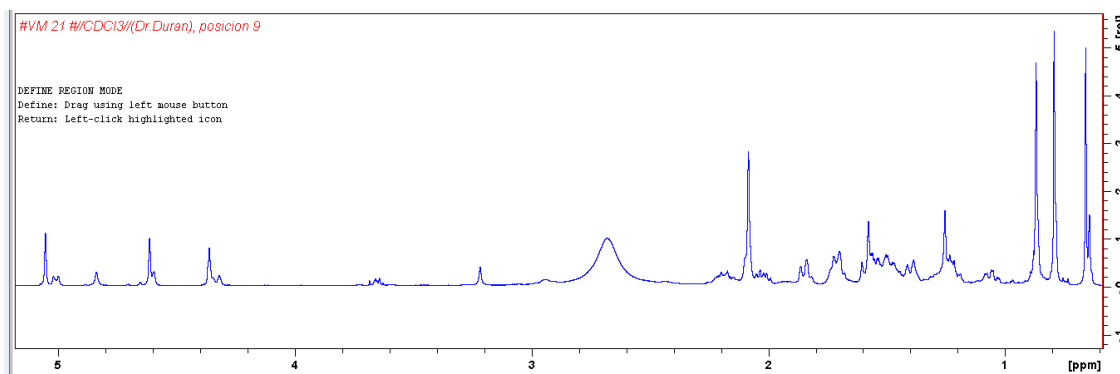
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-11**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-11**.

Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-12**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-12**, com destaque para H-17, H-3 e H-7.

Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-13**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-13**.

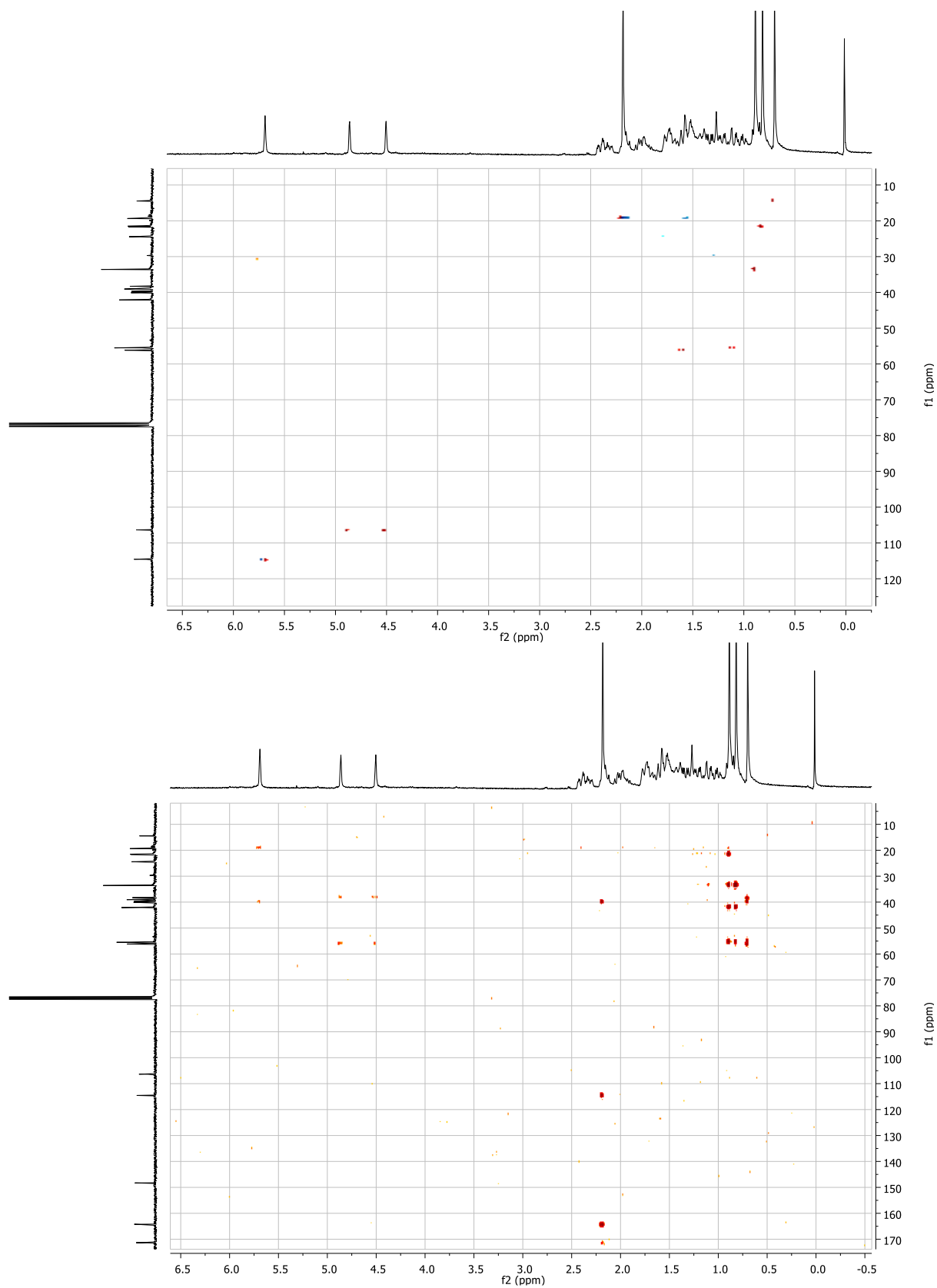
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-18**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-18**.

Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-20**.

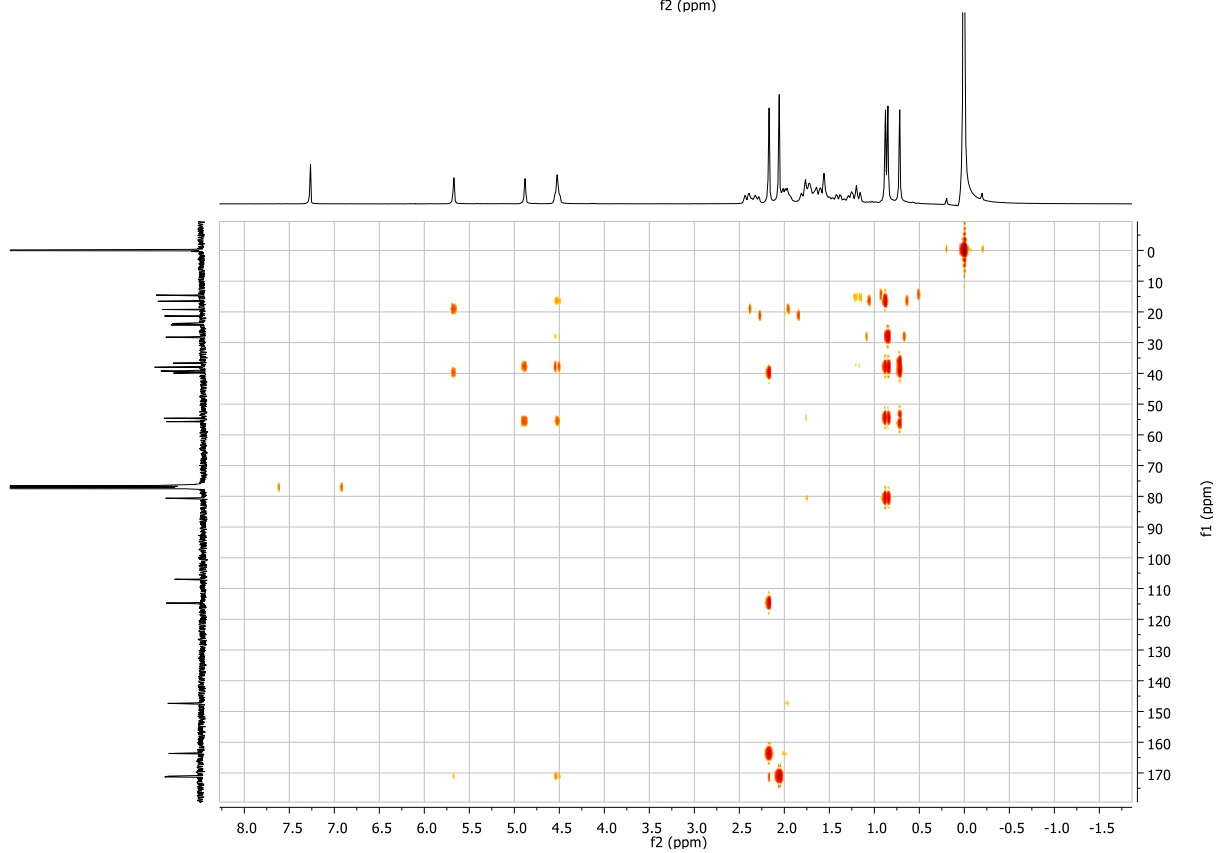
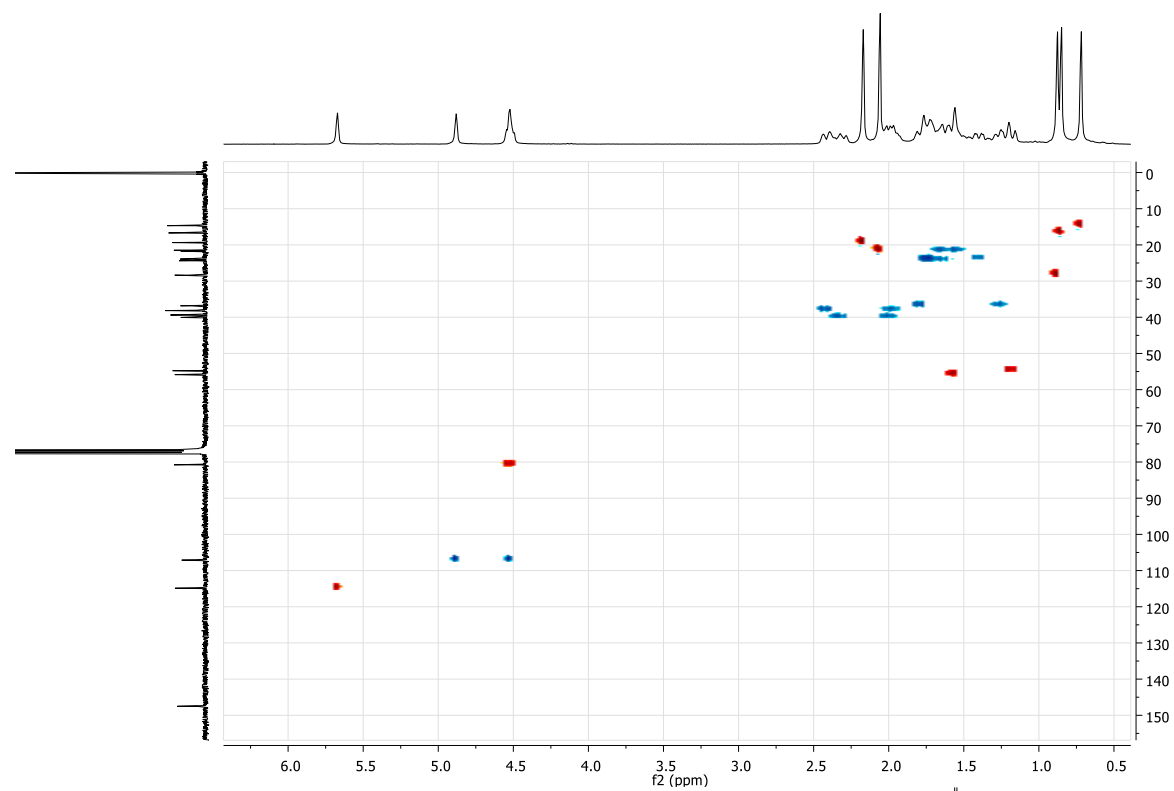
Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **VM-21**.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **VM-21**.

APÊNDICE 5 – ESPECTROS BIDIMENSIONAIS

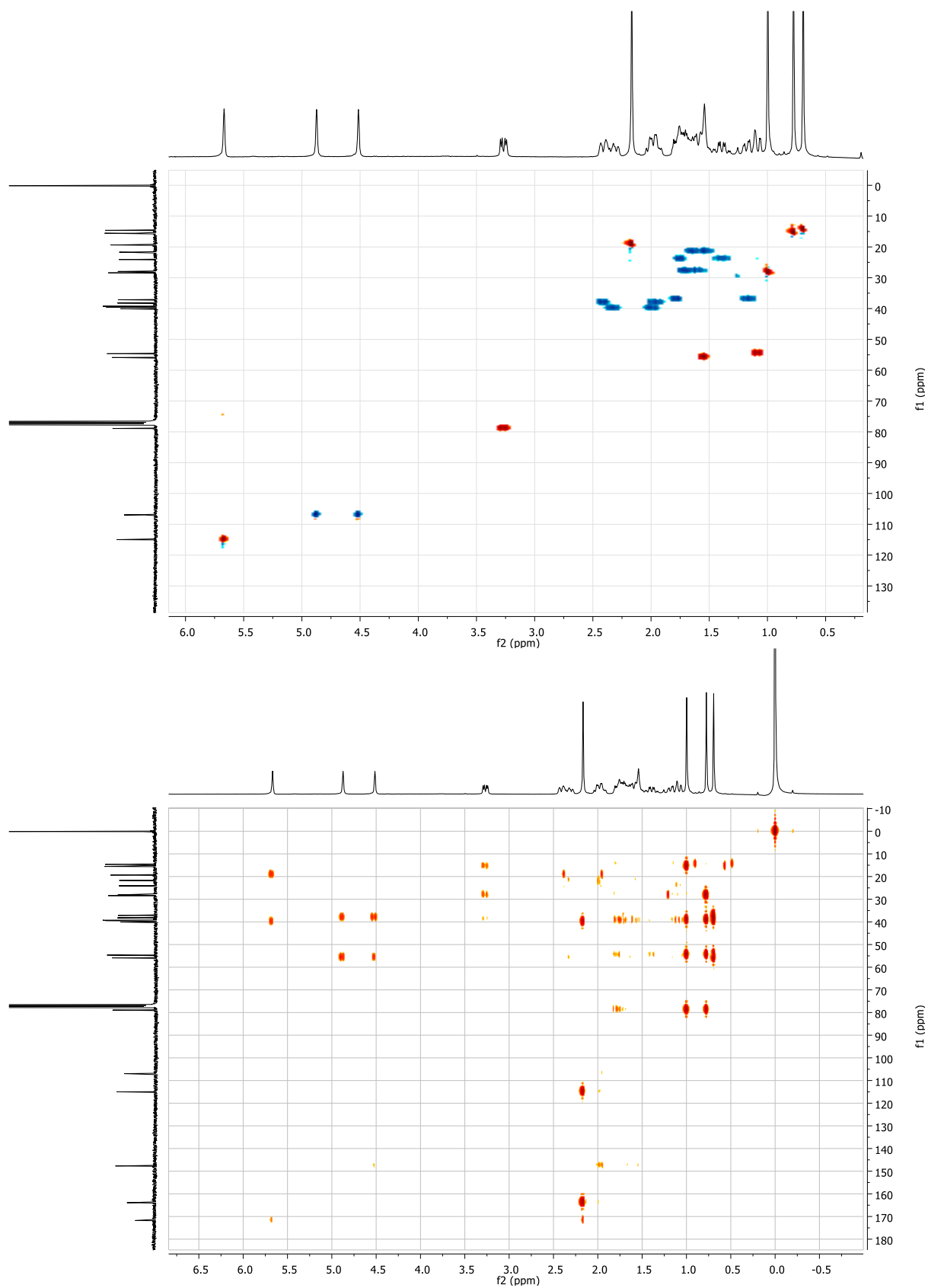
Espectro de HSQC-dept e de HMBC de AC

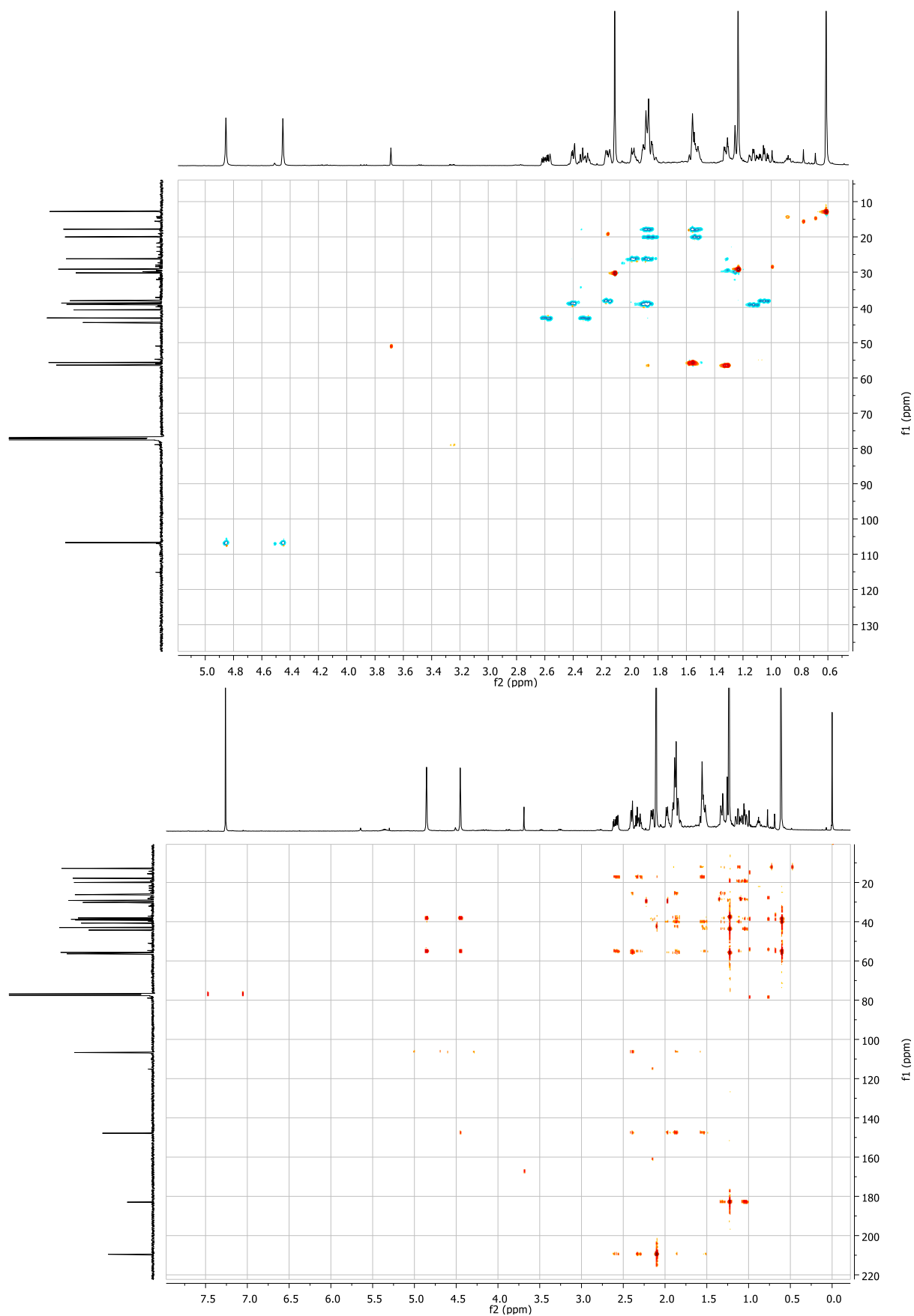


Espectro de HSQC-dept e de HMBC de AAC

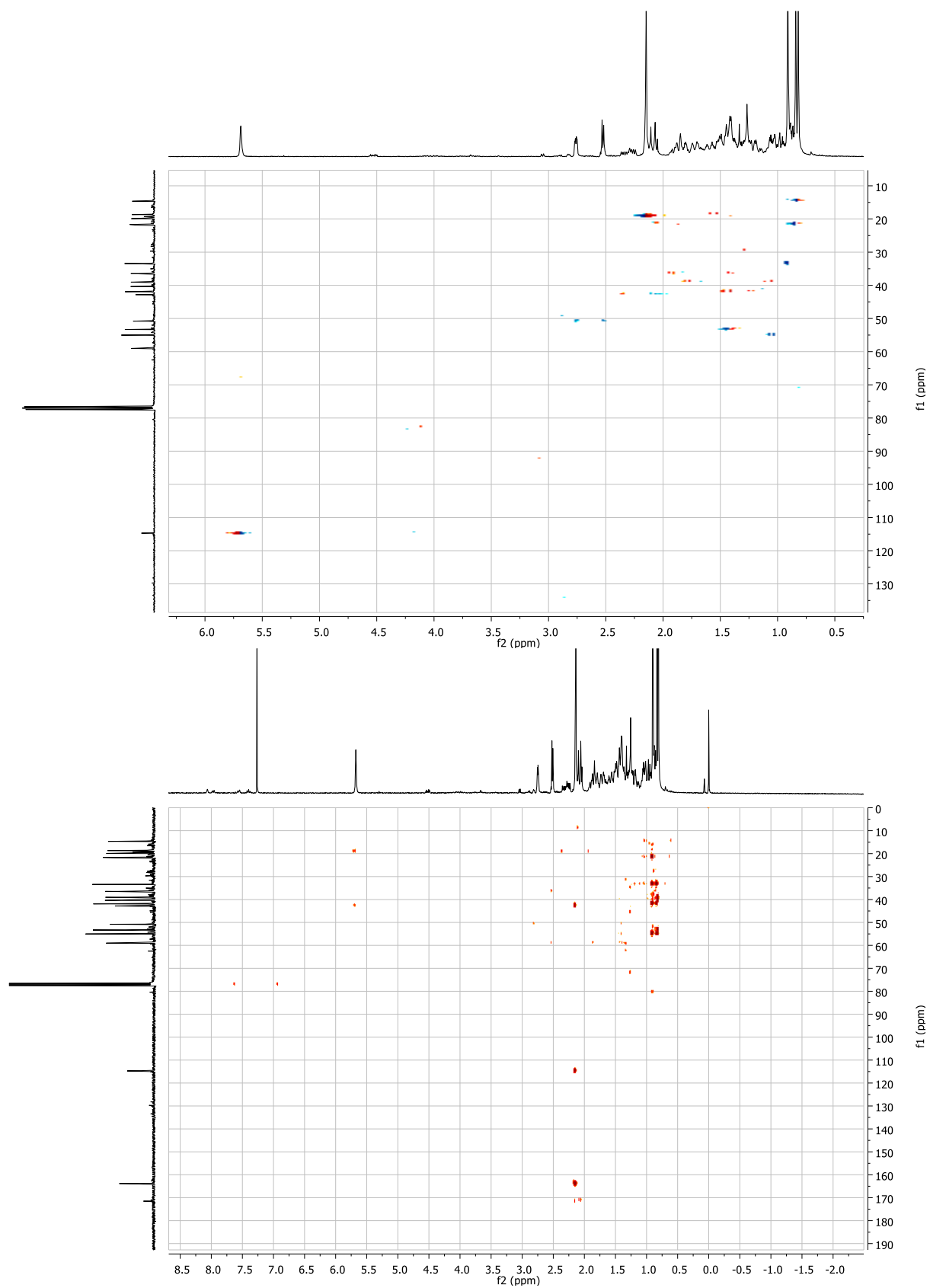


Espectro de HSQC-dept e de HMBC de AHC

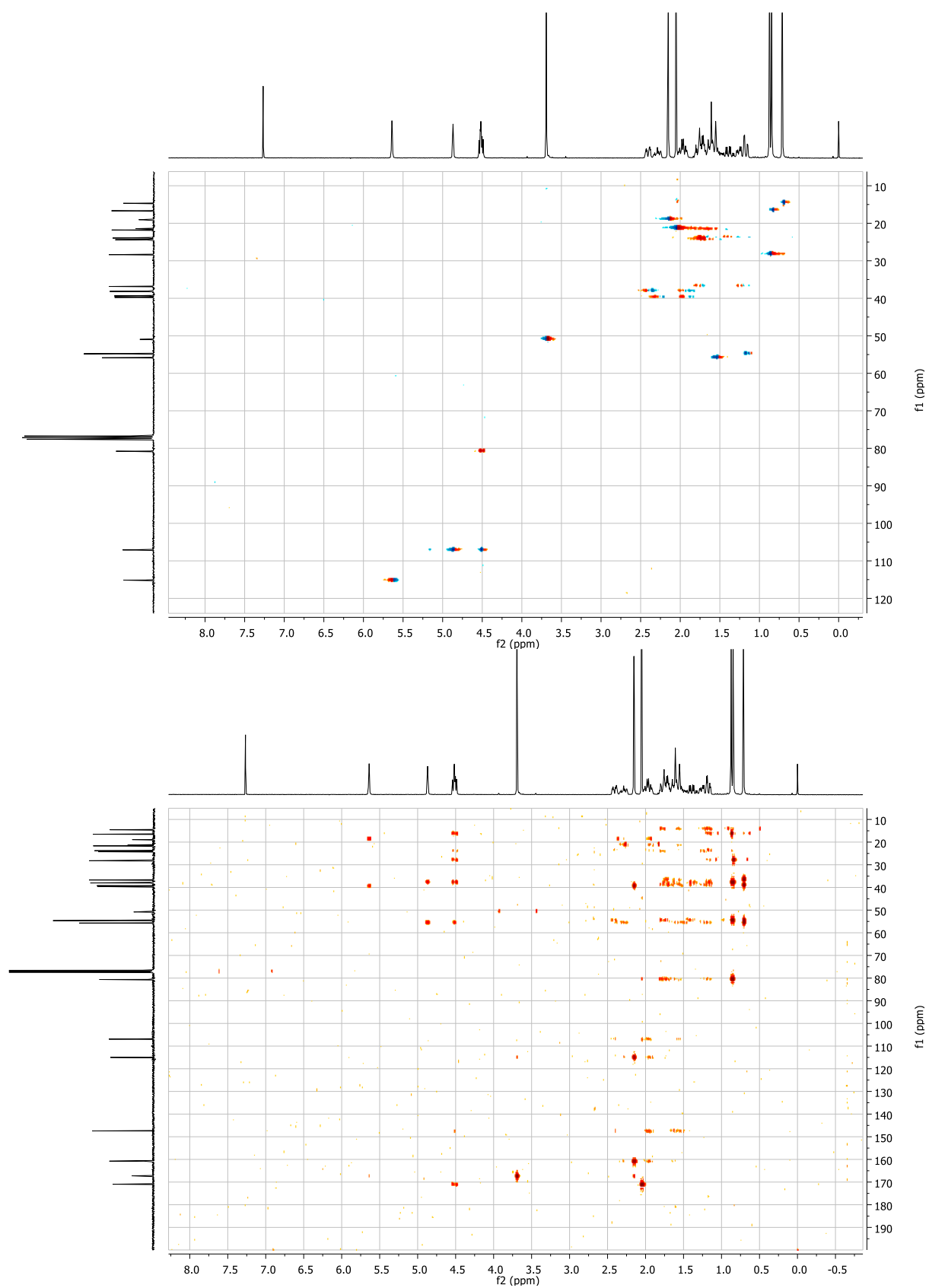


Espectro de HSQC-dept e de HMBC de **COP1**

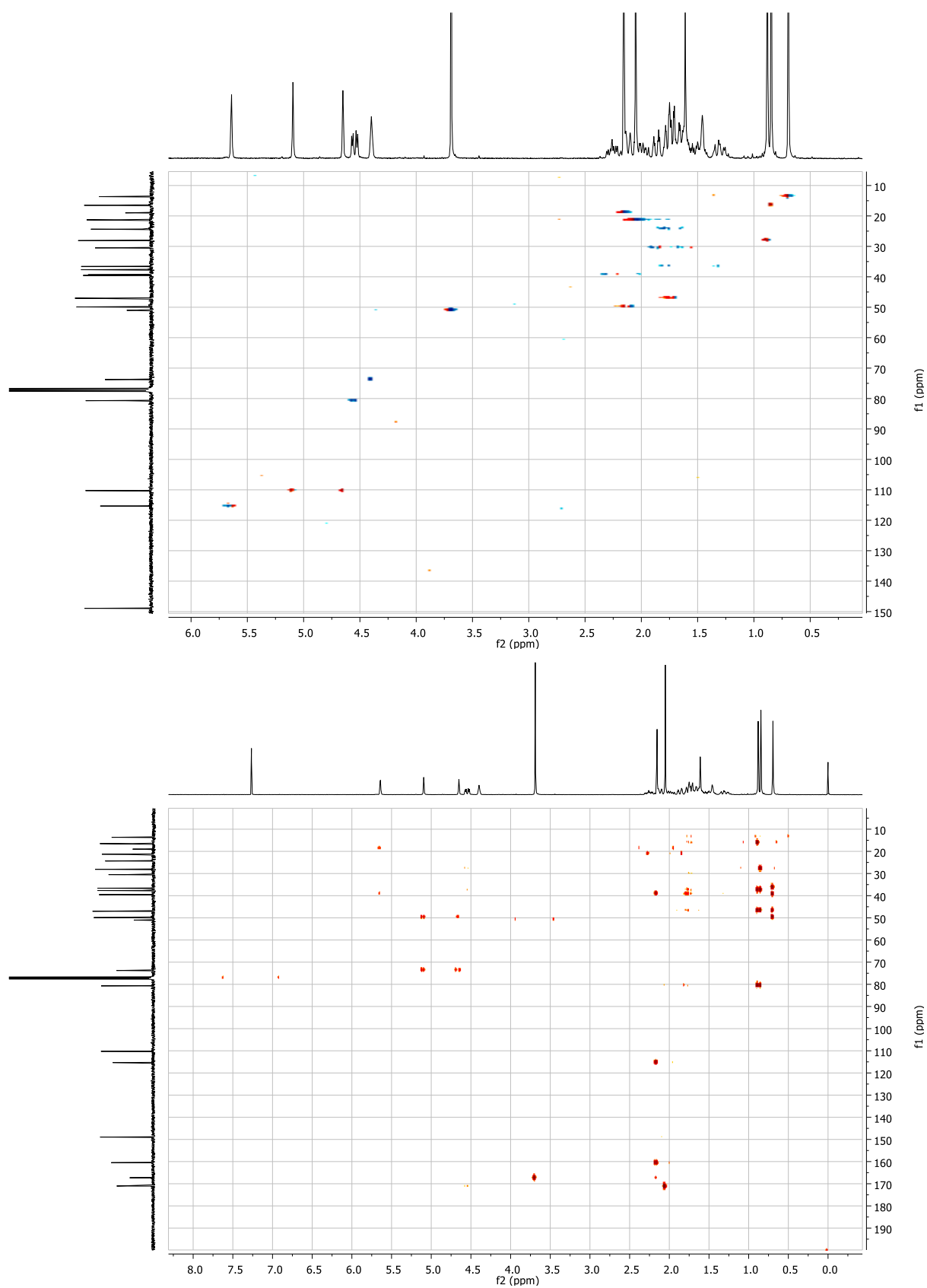
Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-07



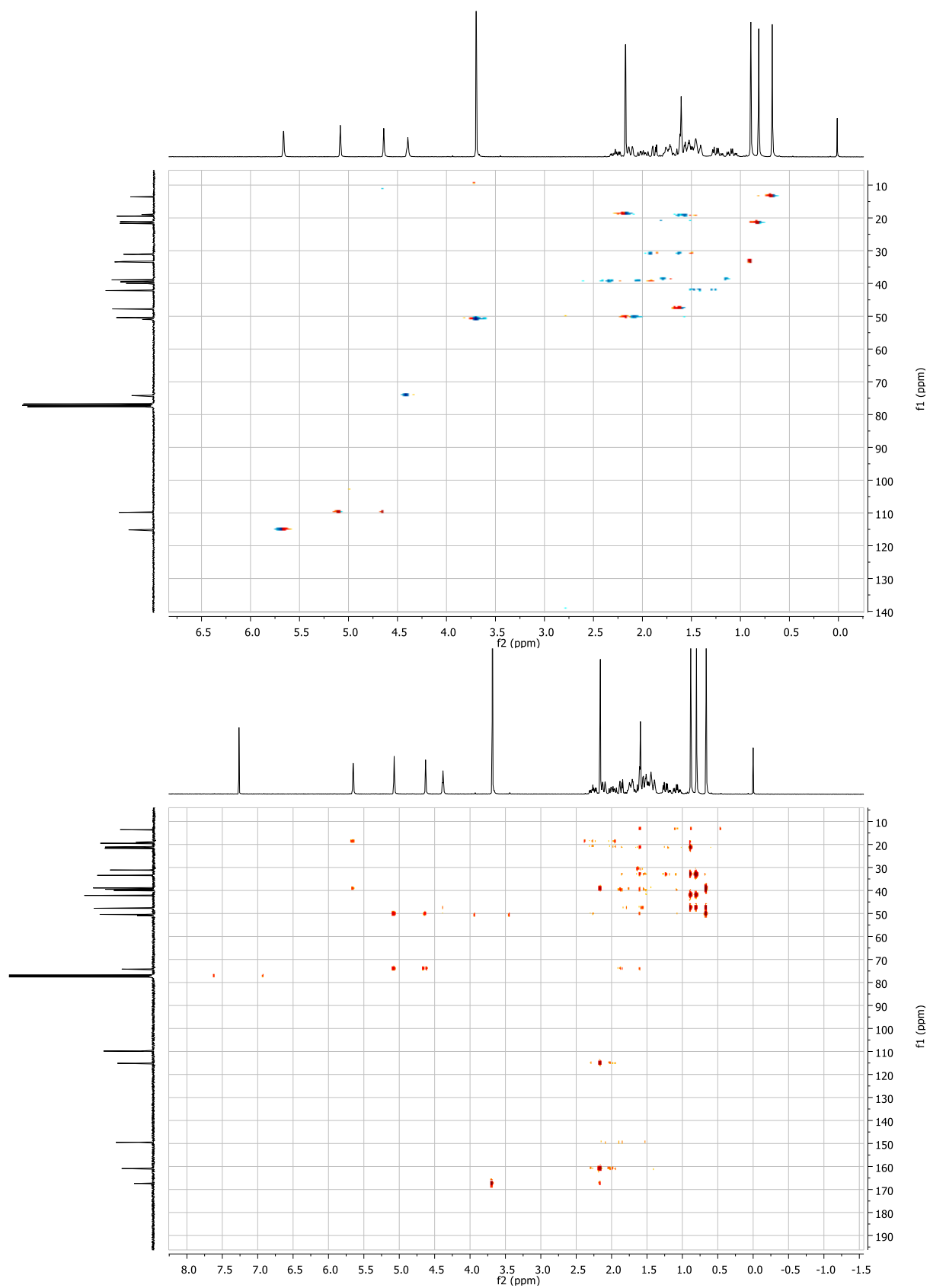
Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-09



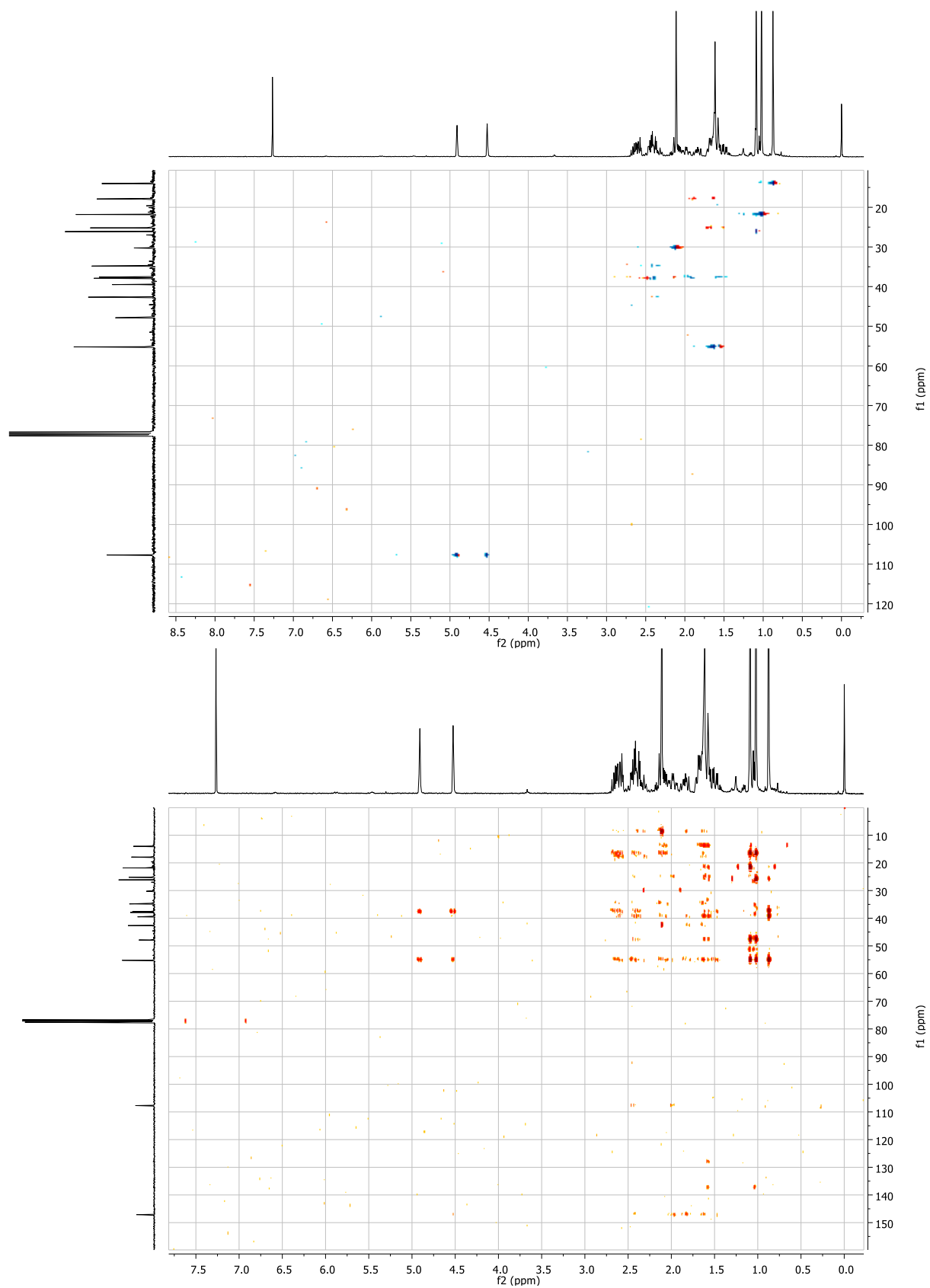
Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-12



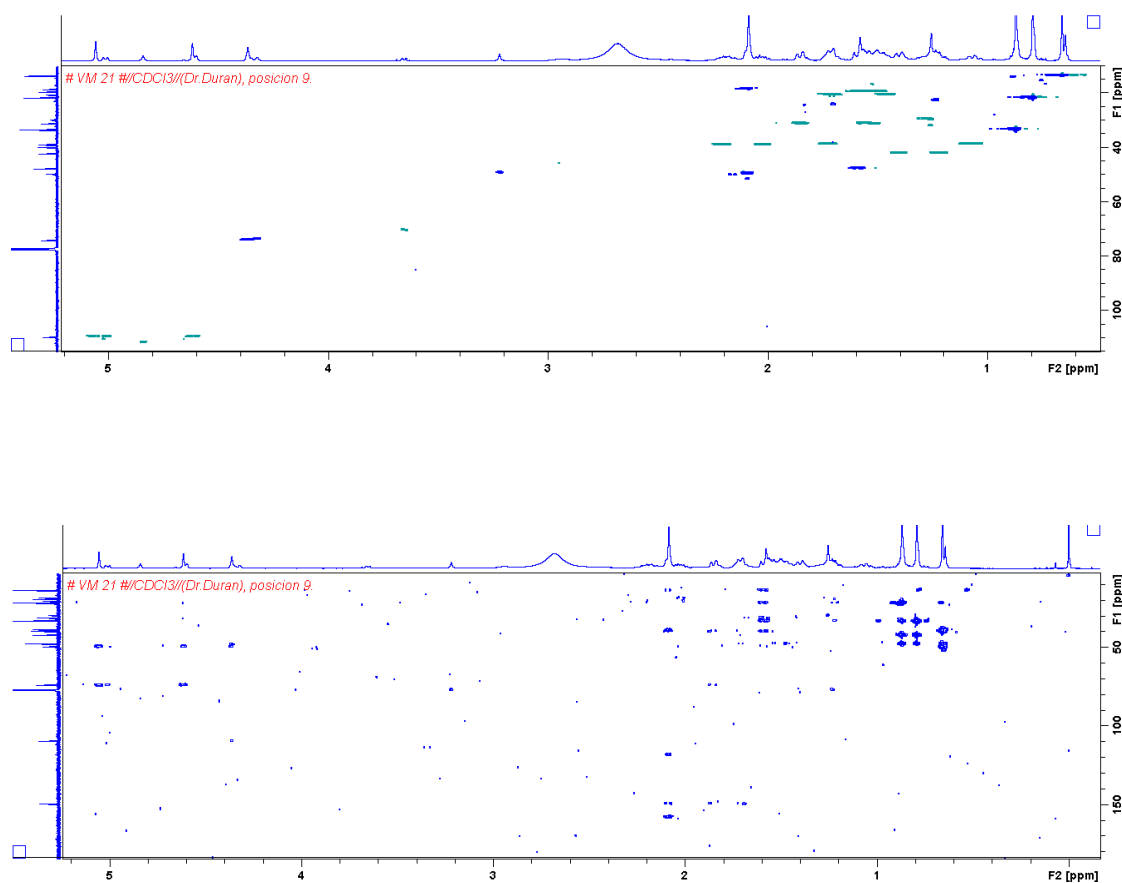
Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-13



Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-18

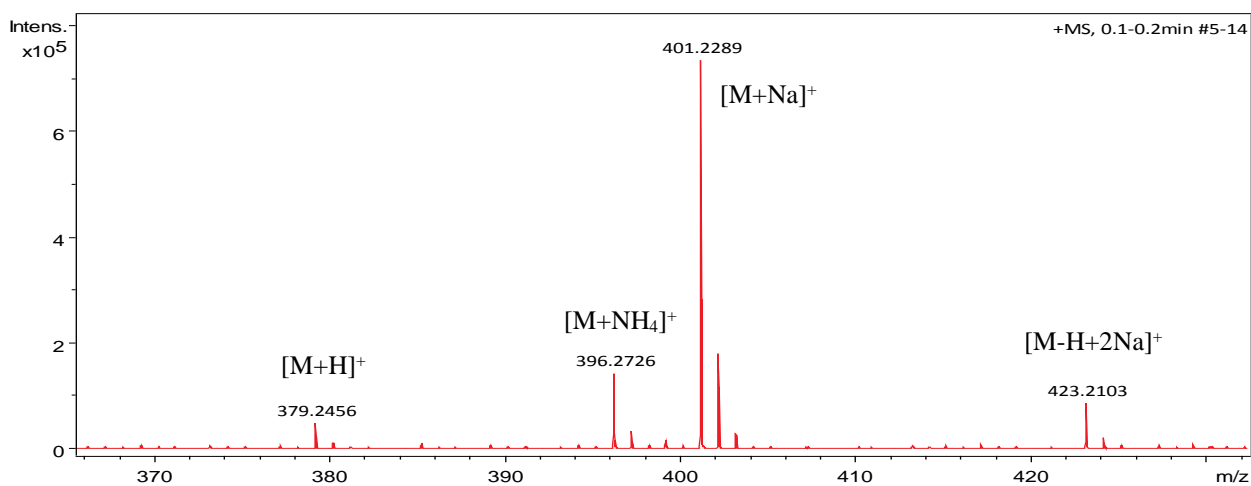


Espectro de HSQC-dept e de HMBC de VM-21



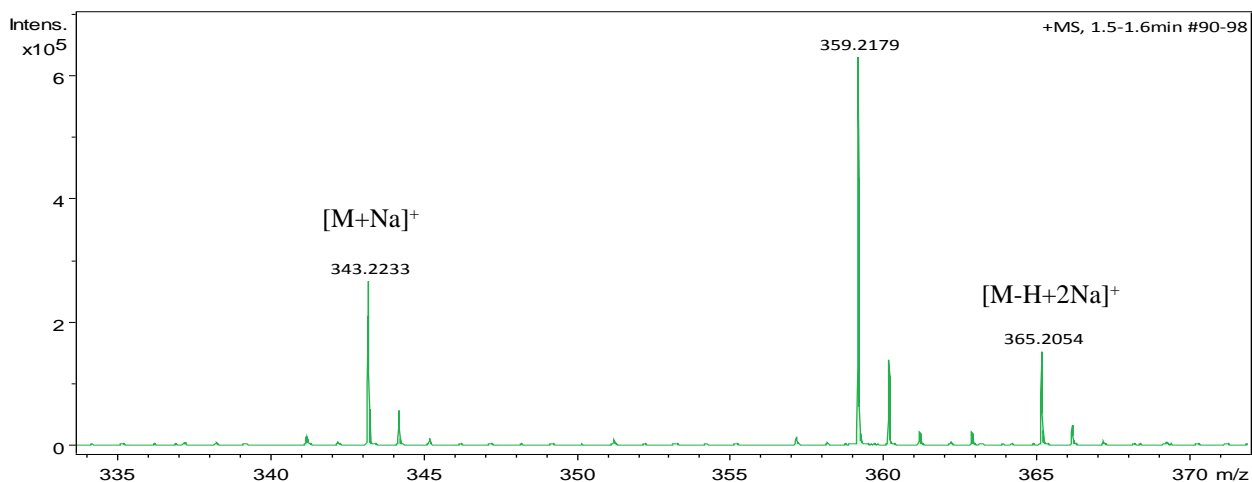
APÊNDICE 6 – ESPECTROS DE MASSAS

Espectro de massas de VM-03



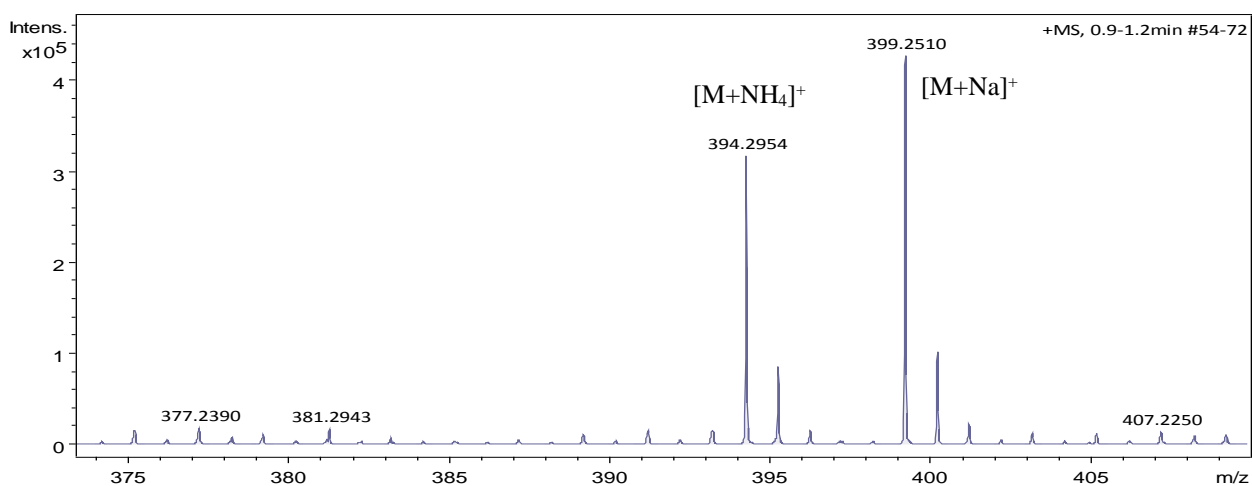
Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-rule
379.2456	C ₂₂ H ₃₅ O ₅	379.2479	6.0	25.6	5.5	even	ok
396.2726	C ₂₂ H ₃₈ NO ₅	396.2744	4.8	19.4	4.5	even	ok
401.2289	C ₂₂ H ₃₄ NaO ₅	401.2298	2.3	1.5	5.5	even	ok
423.2103	C ₂₂ H ₃₃ Na ₂ O ₅	423.2118	3.4	6.4	5.5	even	ok

Espectro de massass de VM-07



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-rule
343.2233	C ₂₀ H ₃₂ NaO ₃	343.2244	3.2	8.7	4.5	even	ok
359.2179	C ₂₀ H ₃₂ NaO ₄	359.2193	3.9	1.1	4.5	even	ok
365.2054	C ₂₀ H ₃₁ Na ₂ O ₃	365.2063	2.4	8.6	4.5	even	ok

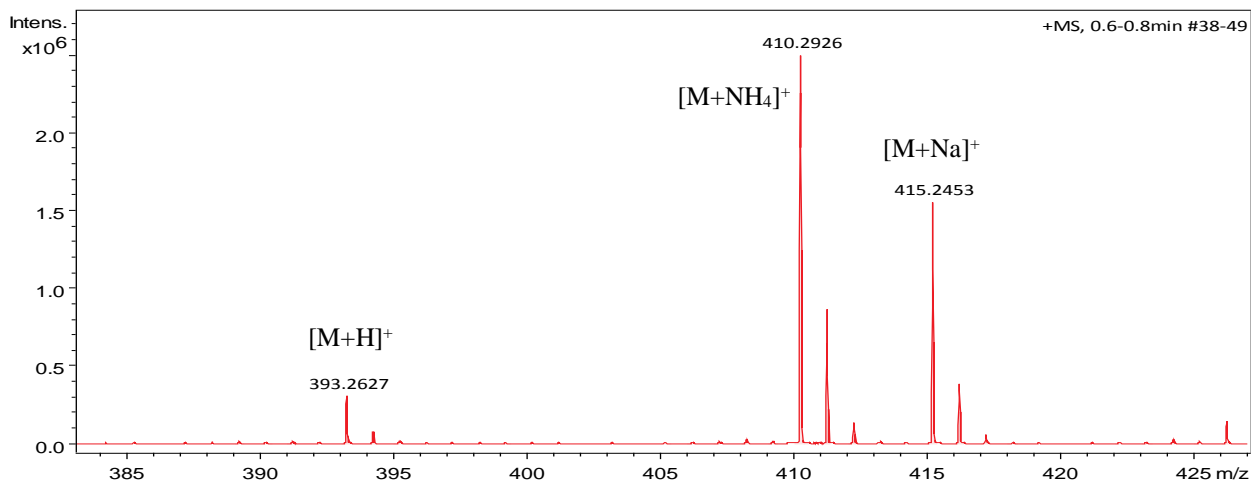
Espectro de massass de VM-09



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-rule
--------------	-------------	-----	--------------	--------	-----	------------------------	--------

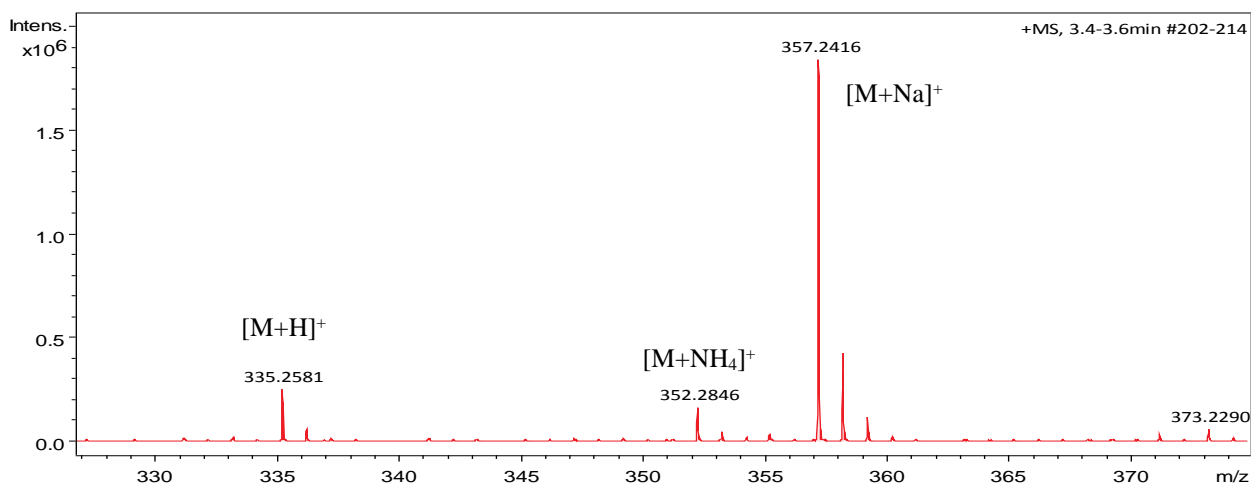
394.2954	C ₂₃ H ₄₀ NO ₄	394.2952	-0.4	28.5	4.5	Even	ok
399.2510	C ₂₃ H ₃₆ NaO ₄	399.2506	-1.1	24.9	5.5	Even	ok

Espectro de massass de VM-12



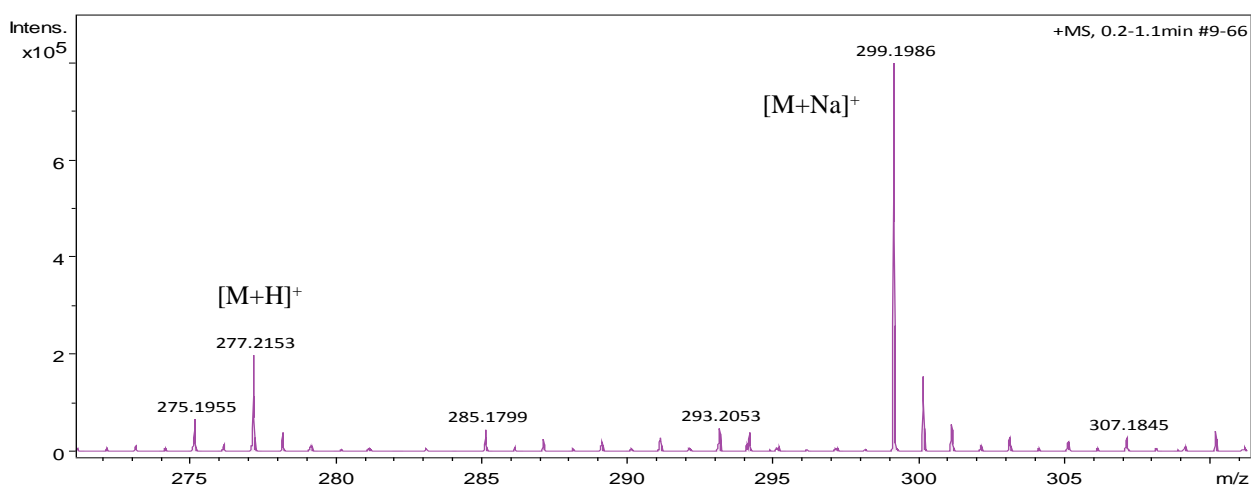
Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-rule
393.2627	C ₂₃ H ₃₇ O ₅	393.2636	2.2	9.4	5.5	even	ok
410.2926	C ₂₃ H ₄₀ NO ₅	410.2901	-6.2	50.6	4.5	even	ok
415.2453	C ₂₃ H ₃₆ NaO ₅	415.2455	0.5	5.1	5.5	even	ok

Espectro de massass de VM-13



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	e ⁻ Conf	N-rule
335.2581	C ₂₁ H ₃₅ O ₃	335.2581	-0.0	3.1	even	ok
352.2846	C ₂₁ H ₃₈ NO ₃	352.2846	0.1	42.5	even	ok
357.2416	C ₂₁ H ₃₄ NaO ₃	357.2400	-4.4	17.5	even	ok

Espectro de massass de VM-18



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-rule
277.2153	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	277.2162	3.4	13.5	4.5	even	ok
299.1986	C ₁₈ H ₂₈ NaO ₂	299.1982	-1.6	13.7	4.5	even	ok