UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação do potencial tripanocida de derivados do
ácido copálico**

Gisele Bulhões Portapilla

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação do potencial tripanocida de derivados do
ácido copálico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Gisele Bulhões Portapilla

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 26/09/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP.

Ribeirão Preto
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Portapilla, Gisele Bulhões

Determinação do potencial tripanocida de derivados do ácido copálico. Ribeirão Preto, 2014.

104p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências aplicadas a Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio de.

1. Terpenos.
2. Reações de síntese
3. Atividade Farmacológica.
4. *Trypanosoma cruzi*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gisele Bulhões Portapilla

Determinação do potencial tripanocida de derivados do ácido copálico

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais,
**Lourival Portapilla e Regina Ap. B.
Portapilla**, com imensa gratidão por todo
amor, apoio e incentivo devotados a mim e
a toda família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela forte presença em minha vida. Obrigada pelas graças e oportunidades concedidas. “Porquanto o Senhor teu Deus é Deus misericordioso, e não te desampará, nem te destruirá, nem se esquecerá da aliança que jurou a teus pais” (Deuteronômio 4:31).

*A minha **mãe**, pelo amor incondicional. Pela insistência sobre a importância dos estudos, pelo incentivo e direcionamento. Ao meu **pai**, por ser um exemplo de humildade, bondade e do verdadeiro amor paterno. Agradeço a vocês por todos os sacrifícios devotados à família e pela presença em todas as fases da minha vida. Amo vocês!*

*Às minhas irmãs **Ariane** e **Valéria**, pela amizade e companheirismo. Agradeço pela companhia, pela paciência para ouvir minhas lamúrias e por todos os conselhos. Ao meu sobrinho, **Víctor**, por trazer mais alegria e felicidade ao nosso lar. Agradeço ainda, a toda minha família repleta de pessoas boas e compreensivas.*

*Ao meu amor, meu amigo e namorado **Henrique**, por não impor limites para incentivar todas as minhas decisões. Agradeço pela compreensão, carinho e respeito. Te amo!*

*Ao **Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque**, pela orientação, confiança e apoio. Agradeço imensamente pela oportunidade que proporcionou um grande amadurecimento profissional e pessoal.*

*Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, **Cristiana Gonzalez**, **Georgius Luiz de Oliveira** e **Míriam Paula Alonso Toldo**, pelos ensinamentos e auxílios fundamentais durante os experimentos realizados no laboratório.*

*Em especial, agradeço à funcionária e querida amiga **Inara Fernanda Lage Gallo**. O seu apoio foi fundamental para abrandar as dificuldades encontradas durante a execução desse trabalho. Obrigada por ajudar nos experimentos e por permanecer no laboratório além do seu horário de trabalho. Agradeço imensamente pela amizade, pela companhia, por ouvir minhas lamentações e pelas palavras de incentivo. Certamente, você tornou minha jornada mais fácil e repleta de amor e carinho. Serei eternamente grata a você. Te adoro!*

*Aos meus amigos de laboratório, **Luiz**, **Kelly**, **Mariana**, **Vânia**, **Fabricia** e **Marina**, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelos favores e troca de conhecimentos.*

*A todos os alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP. Em especial, agradeço a **Izabel Cristina Casanova Turatti** pela disponibilidade para as análises (CG/EM) realizadas.*

*Agradeço ao **Dr. João Paulo Barreto Souza** pela amizade, pela paciência, por todo conhecimento transmitido e acompanhamento dos experimentos. Meus sinceros agradecimentos pelo respeito ao meu tempo de aprendizado e pela disponibilidade em ajudar.*

*Ao **Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki** por ser solícito em disponibilizar o laboratório e alunos para a execução das reações de síntese desse trabalho. À aluna de doutorado, **Evelin Pina Diniz** pela paciência, carinho e ajuda.*

*Ao aluno de pós-doutorado, **Rafael Augusto Soldi**. Agradeço imensamente por realizar as reações de síntese desse trabalho. A sua colaboração foi imprescindível para a conclusão dessa etapa. Muito obrigada pela paciência, por se dispor a ajudar e por toda sua dedicação. Sou muito grata a você!*

*A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP por toda ajuda e por me receberem com tanto carinho. Em especial, agradeço à aluna de doutorado, **Tatiane Cruz de Carvalho**, pela atenção e disponibilidade em realizar as análises de CLAE. À aluna de doutorado, **Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes**, pela amizade, pelos ensinamentos e por acompanhar parte dos experimentos realizados.*

*Aos funcionários **Mário Sadaiti Ogasawara**, **Walter Lopes** e **Maria Angelica dos Santos Cunha Chellegatti** pela paciência e solicitude. Ao funcionário **Vinícius Palaretti** pelas análises de RMN.*

*Ao **Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos** por disponibilizar o laboratório, por todo conhecimento transmitido e por acompanhar meus experimentos. Obrigada pelo direcionamento, pelas ideias e sugestões. Todo meu respeito e admiração!*

*Aos funcionários da FCFRP-USP, **Vânia Cláudia de Albuquerque** e **Henrique Theodoro** pela dedicação e profissionalismo.*

*As minhas amigas com que tive o prazer de residir, **Mariana Vieira**, **Takae**, **Mariana Melo**, **Ariane** e **Nádia**. Obrigada pelos momentos de descontração, pela amizade, carinho e por tornar minha vivência em Ribeirão tranquila e feliz. Em especial, agradeço a **Nádia**, minha amiga querida, pela amizade que começou na graduação, mas que resiste mesmo aos problemas e adversidades da vida. Obrigada pela paciência, pelo carinho e pela sincera amizade.*

*À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2012/02105-1 e projeto regular nº 2012/16168-5, pela bolsa concedida e apoio financeiro, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.*

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de Esquemas	vi
Lista de Abreviaturas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	1
1.2 Doença de Chagas	2
1.3 Quimioterapia da doença de Chagas	7
1.4 Atividade biológica dos terpenos	9
1.5 Oleorresina de copaíba e constituintes com atividade farmacológica	12
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Fluxograma de execução dos experimentos.....	19
3.2 Materiais utilizados nos processos de obtenção e análise dos compostos	19
3.3 Materiais utilizados para realização dos testes <i>in vitro</i>	21
3.4 Parte 1. Obtenção do ácido copálico	21
3.4.1 Obtenção e análise do oleorresina de copaíba	22
3.4.2 Metodologia para obtenção da fração de diterpenos do oleorresina de copaíba	22
3.4.3 Cromatografia clássica em modelo de coluna curta (<i>short column model</i> - SCM)	22
3.4.4 Extração ácido-base do oleorresina de copaíba.....	23
3.4.5 Obtenção do Ácido Copálico	25
3.4.6 Síntese dos derivados semissintéticos do ácido copálico.....	27
3.4.7 Obtenção do derivado amida a partir do ácido copálico	27
3.4.8 Reação de esterificação do ácido copálico	28
3.5 PARTE 2. Obtenção de derivados semissintéticos do óxido de cariofileno	29

3.5.1 Fluxograma da para obtenção de derivados semissintéticos do óxido de cariofileno.....	29
3.5.2 Obtenção do óxido de cariofileno	29
3.5.3 Reação de hidrogenação catalítica	30
3.5.4 Abertura de anel epóxido com Hidreto de Lítio e Alumínio (LiAlH ₄)	30
3.5.5 Obtenção do derivado 4	32
3.5.6 Reação de acetilação de D2 para obtenção do derivado 5	32
3.5.7 Reação de acetilação de D3 para obtenção do derivado 6	33
3.5.8 Reação de D2 com Iodo	35
3.5.9 Reação de D3 com Iodo	35
3.6 Compostos avaliados.....	36
3.7 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
3.8 Testes de viabilidade nas formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
3.9 Testes de viabilidade nas formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.10 Análise estatística.....	38
 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 Análise do oleorresina de copaíba e obtenção da fração de diterpenos	40
4.2 Obtenção do ácido copálico	42
4.3 Síntese parcial de derivados do óxido de cariofileno.....	48
4.3.1 Reação de hidrogenação catalítica	48
4.3.2 Redução com Hidreto de Lítio e Alumínio (LiAlH ₄)	49
4.3.3 Acetilação de D2 e D3	54
4.3.4 Reação de D2 e D3 com Iodo (I)	56
4.4 Testes biológicos <i>in vitro</i>	56
4.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade das substâncias estudadas	56
4.4.2 Testes de viabilidade nas formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
 5. CONCLUSÕES.....	68
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
 APÊNDICES	83

RESUMO

PORTAPILLA, G. B. **Determinação do potencial tripanocida de derivados do ácido copálico**. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença de Chagas é uma das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) e considerada um importante problema de saúde pública, pois acomete milhares de pessoas e outras, permanecem expostas ao risco de infecção. É descrito que as terapias disponíveis baseadas no benzonidazol e nifurtimox, provocam severos efeitos colaterais, além de possuírem baixa eficácia durante a fase crônica da doença. Estudos fitoquímicos relatam que o oleorresina de copaíba, extraído de árvores do gênero *Copaifera*, é constituído por diversos terpenos que apresentam alta atividade e seletividade contra *Trypanosoma cruzi*. Portanto, na busca de moléculas alternativas para tratamento dessa patologia, o objetivo deste trabalho consistiu em determinar o potencial tripanocida *in vitro* de derivados semissintéticos, obtidos a partir dos terpenos óxido de cariofileno e ácido copálico. O ácido copálico foi obtido por métodos cromatográficos, porém devido às dificuldades encontradas durante a execução do trabalho, não foram obtidos derivados semissintéticos a partir dessa substância embora, algumas das metodologias propostas proporcionaram a obtenção do diterpeno ácido 19-*ent*-cauranóico, pouco descrito na literatura. As reações de síntese para o óxido de cariofileno resultaram em oito derivados semissintéticos (**D1** a **D8**). Logo, no presente trabalho foram determinadas as atividades biológicas *in vitro* dos seguintes compostos: óleo de copaíba, ácido 19-*ent*-cauranóico, ácido copálico, óxido de cariofileno, os derivados **D1** a **D7** e benzonidazol. **D8** foi instável a presença de luz. A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada sobre a linhagem celular de mamífero LLC-MK2 e os ensaios tripanocidas, obtidos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y e Bolívia. Todas as substâncias apresentaram citotoxicidade moderada, porém as modificações estruturais em **D1**, **D2**, **D3** foram importantes por reduzir o efeito tóxico sobre células LLC-MK2. Os derivados semissintéticos do óxido de cariofileno apresentaram maior atividade sobre as formas evolutivas de *T. cruzi* quando comparados ao produto bruto. Além disso, a ação da maioria dessas substâncias demonstrou ser mais seletiva para os parasitos do que para células de mamífero. Deve-se destacar que a estrutura química de **D3** mostrou-se promissora, pois os resultados indicaram que o derivado foi efetivo tanto para reduzir a citotoxicidade quanto por ser ativo para ambas as formas das cepas Y e Bolívia. Os dados obtidos neste trabalho confirmam a efetividade da química orgânica sintética como um mecanismo ímpar para potencializar a ação de substâncias terapeuticamente úteis, de modo que estudos posteriores serão realizados a fim de determinar a atividade desses novos compostos em protocolos *in vivo*, bem como determinar os possíveis mecanismos de ação dos mesmos, sobre estruturas biológicas ou rotas metabólicas do protozoário *T. cruzi*.

Palavras-chave: Terpenos; Reações de síntese; Atividade farmacológica; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

PORTAPILLA, G. B. **Trypanocidal potential of copalic acids derivatives**. 2014, 104f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chagas' disease is one of the most important tropical neglected diseases in global public health, affecting thousands of people, and exposing other ones to the infection risk. According to the literature, therapies with benznidazole and nifurtimox cause serious side effects, and show low efficacy during the chronic phase of the disease. Phytochemical studies showed that copaiba oils obtained from threes of *Copaifera* genus present several terpenes that show high activity and selectivity against *Trypanosoma cruzi*. In order to search alternative molecules for this treatment, the aim of this study was to determine the *in vivo* potential trypanocidal effect of semisynthetic derivatives obtained by the terpenes caryophyllene oxide and copalic acid. We obtained copalic acid by chromatographic methods but due some difficulties during the procedure, we could find no semisynthetic derivatives from this substance besides, some purposed methodologies allowed the obtaining of the diterpene acid 19-*ent*-cauranoic that was not commonly described on the literature. The synthesis reactions for caryophyllene oxide resulted in eight semisynthetic derivatives (**D1** to **D8**). So, we could determine the *in vivo* biological activities of the following compounds: copaiba oil, acid 19-*ent*-cauranoic, copalic acid, caryophyllene oxide, **D1** to **D8** derivatives, and Benznidazole. **D8** was unstable in the presence of light. Cytotoxic activities of the compounds were evaluated by cellular mammal strain LLC-MK2 and trypanocidal activity assays, obtained from epimastigotes and trypomastigotes forms of Bolivia and Y strains. All the substances showed high activity on the evolutive forms of *T. cruzi* when compared with the row product. Besides, the action of great part of the substances has been shown more selectivity for parasites than the mammals' cells. The test results of chemical structure of **D3** showed that its derivative was effective for both cases reducing the toxicity, and being active for Bolivia and Y strains. Obtained data confirmed the effectiveness of the synthetic organic chemistry as a very important way to increase the action of substances therapeutically so useful that posterior studies will be accomplished in order to determine the activity of these new *in vivo* compounds protocols, as well as to indicate its possible action mechanisms on biological structures or metabolic routes of the protozoa *T. cruzi*.

Key words: Terpenes; Synthesis reactions; Pharmacological activity; *Trypanosoma cruzi*.

RESUMEN

PORTAPILLA, G. B. **Determinación del potencial tripanocida de los derivados del ácido copálico**. 2014, 104f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La enfermedad de Chagas es una de las principales enfermedades tropicales negligenciadas siendo considerada importante problema de salud pública, pues acomete millares de personas, además de otras que permanecen expuestas al riesgo de infección. Se describe que las terapias disponibles basadas en benzonidazol y nifurtimox, causan severos efectos colaterales, además de presentaren baja eficacia durante la fase crónica de la enfermedad. Estudios fitoquímicos relatan que el aceite de copaiba, extraído de árboles del género *Copaífera*, es constituido por diversos terpenos que presentan alta actividad y selectividad contra el *Trypanosoma cruzi*. Por lo tanto, en la búsqueda de moléculas alternativas para el tratamiento de esa patología, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial tripanocida *in vivo* de derivados semisintéticos obtenidos por medio de los terpenos óxido de cariofileno y ácido copálico. El ácido copálico fue obtenido por métodos cromatográficos pero, debido a las dificultades encontradas durante la ejecución del trabajo, no fueron obtenidos derivados semisintéticos a partir de esa sustancia. Además, algunas de las metodologías propuestas proporcionaron la obtención del diterpeno ácido 19-*ent*-cauranoico, poco descrito en la literatura. Las reacciones de síntesis para el óxido cariofileno resultaran en ocho derivados semisintéticos (**D1** a **D8**). Así, en el presente trabajo fueron determinadas las actividades biológicas *in vitro* de los siguientes compuestos: aceite de copaiba, ácido 19-*ent*-cauranoico, ácido copálico, óxido cariofileno, los derivados **D1** a **D7** y Benzonidazol. **D8** fue inestable en presencia de la luz. La actividad citotóxica de los compuestos fue evaluada sobre el linaje celular del mamífero LLC-MK2 y los ensayos tripanocidas, obtenidos sobre las formas epimastigotas y tripomastigotas de las cepas Bolivia e Y. Todas las sustancias presentaron mayor actividad sobre las formas evolutivas del *T. cruzi* cuando comparadas al producto bruto. Además, la acción de la mayoría de esas sustancias demostró ser más selectiva para los parásitos que para las células del mamífero. Se debe destacar que la estructura química del **D3** se mostró promisor, pues los resultados indicaron que el derivado fue efectivo tanto para reducir la citotoxicidad cuanto por ser activo para ambas las formas de las cepas Bolivia e Y. Los datos obtenidos en este trabajo confirmaron la efectividad de la química orgánica sintética como un mecanismo impar para potencializar la acción de sustancias terapéuticamente útiles, de manera que estudios posteriores serán realizados con el objetivo de determinar la actividad de esos nuevos compuestos en protocolos *in vivo*, así como determinar los posibles mecanismos de acción de los mismos sobre estructuras biológicas o rutas metabólicas del protozoario *T. cruzi*.

Palabras llaves: Terpenos; Reacciones de síntesis; Actividad farmacológica; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo simplificado de transmissão do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2. Estrutura química do nifurtimox e benzonidazol.....	7
Figura 3. Estrutura química do isopreno	10
Figura 4. Estrutura química da Artemisinina	11
Figura 5. Estrutura química do óxido β -cariofileno e óxido de cariofileno	15
Figura 6. Estrutura química do diterpeno ácido copálico.....	15
Figura 7. Perfil cromatográfico do oleorresina de copaíba da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> . Presença de duas regiões de eluição característica de sesquiterpenos e diterpenos.	40
Figura 8. Perfil cromatográfico de CG-EM da amostra FR1	41
Figura 9. Perfil cromatográfico: A) Ácido 19-ent-cauranóico por CLAE. B) Ácido 19-ent- cauranóico por CG-EM	43
Figura 10. Ácido 19-ent-cauranóico.....	44
Figura 11. A) Perfil cromatográfico da fração de diterpenos (FR1) obtida após fracionamento do oleorresina de copaíba. B) Perfil cromatográfico do ácido copálico após fracionamento em coluna cromatográfica com 8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento.....	45
Figura 12. Perfil cromatográfico: A) Ácido copálico por CLAE. B) Ácido copálico por CG- EM	46
Figura 13. Estrutura química do ácido copálico	47
Figura 14. Estrutura química de D1	49

Figura 15. Perfil cromatográfico: (A) Produto da reação de hidrogenação catalítica, D1 ; (B) Perfil cromatográfico do óxido de cariofileno.....	49
Figura 16. Perfil cromatográfico: (A) Produtos da reação com LiAlH_4 , D2 e D3 . (B) óxido de cariofileno.....	50
Figura 17. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, D2 . (B) Segundo conjunto de frações, D3 ; (C) mistura de D2 e D3	50
Figura 18. Espectro de HSQC para D2	51
Figura 19. Espectro de HMQC para D2	52
Figura 20. Estrutura química de D2	52
Figura 21. Espectro de HSQC para o D3	53
Figura 22. Espectro de HMQC para D3	54
Figura 23. Estrutura química de D3	54
Figura 24. Estrutura química de D5	55
Figura 25. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, D5 ; (B) Óxido de cariofileno.....	55
Figura 26. Estrutura química de D6	55
Figura 27. Perfil cromatográfico: (A) Segundo conjunto de frações, D6 ; (B) Óxido de cariofileno.....	55
Figura 28. Estrutura química de D7	56
Figura 29. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, D7 ; (B) Óxido de	

cariofileno.....56

Figura 30. Média dos resultados de citotoxicidade *in vitro* das substâncias e benzonidazol sobre a linhagem LLC-MK2 após 24 horas. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias com o composto padrão benzonidazol. (**p < 0.01; ***p < 0.001). BZL (benzonidazol); OC (óleo de copaíba); AC (ácido copálico); ACau (ácido cauranóico); OxC, (óxido de cariofileno).....58

Figura 31. Média dos resultados de concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas da cepa Y e Bolívia de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias e o composto padrão benzonidazol (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, não significativo). BZL (benzonidazol), OC (óleo de copaíba), AC (ácido copálico), ACau (ácido cauranóico), OxC (óxido de cariofileno).63

Figura 32. Média dos resultados de concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas da cepa Y e Bolívia de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias e o composto padrão benzonidazol (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, não significativo). BZL (benzonidazol), OC (óleo de copaíba), AC (ácido copálico), ACau (ácido cauranóico), OxC (óxido de cariofileno).63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frações obtidas após cromatografia clássica SCM e frações resultantes da reunião das 80 frações de acordo com os padrões de CCDC. Parte da fração em destaque apresentou processo de cristalização em temperatura ambiente.....24
- Tabela 2.** Frações obtidas após cromatografia em coluna clássica de 8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento e frações resultantes da reunião de frações de acordo com os padrões de CCD. Frações em destaques foram avaliadas por RMN26
- Tabela 3.** Média dos resultados de citotoxicidade *in vitro* das substâncias e benzonidazol sobre a linhagem LLC-MK2.....57
- Tabela 4.** Média da concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. O valor de IS entre as células LLC-MK2 e as formas tripomastigotas da cepa Y são apresentados.....61
- Tabela 5.** Média da concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. O valor de SI entre as células LLC-MK2 e as formas tripomastigotas da cepa Bolívia são apresentados.....62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação do ácido copálico com benzilamina	28
Esquema 2. Reação de obtenção do éster do ácido copálico.....	28
Esquema 3. Resumo esquemático dos compostos obtidos a partir das reações com óxido de cariofileno.....	29
Esquema 4. Reação de hidrogenação catalítica do óxido de cariofileno.....	30
Esquema 5. Reação do óxido de cariofileno com LiAlH_4	31
Esquema 6. Reação de acetilação de D2	33
Esquema 7. Reação de acetilação de D3	34
Esquema 8. Reação de D2 com Iodo.....	35
Esquema 9. Reação de D3 com Iodo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C/min	graus Celsius por minuto
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análises de variância (<i>Analysis of variance</i>)
ATPase	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphatase</i>)
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
CC50	Concentração Citotóxica de 90%
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG	cromatografia de fase gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCC	N,N'-diclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMAP	dimetilaminopiridina
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EM	espectrometria de massas
ERO	espécies reativas de oxigênio
eV	elétron volt
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Fe II	Ferro II
FFCLRP	Faculdade de filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto
FR1	Fração 1
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IC50	Concentração Inibitória de 50%
IS	Índice de seletividade
LIT	Meio de cultura <i>Liver Infusion Tryptose</i>

LLC-MK2	Linhagem epitelial de tecido renal de macacos <i>rhesus</i> (Macaca mulatta)
LPS	Lipopolissacarídeo
MHz	Mega Hertz
D1 a D8	Abreviatura para os oito derivados obtidos por síntese química
mL/min	mililitro por minuto
MM	massa molecular
mm	milímetro
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
NEQs	Novas Entidades químicas
nm	nanômetro
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pd/C	paládio sobre carbono ativado
PMS	Phenazine methosulfate
PPh ₃	trifenilfosfina
ppm	partes por milhão
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹³ C
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de ¹ H
RPMI-1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCM	<i>short column model</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
THF	tetrahidrofurano
TMS	tetrametilsilano
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
UV	ultravioleta
µg/mL	micrograma por mililitro
µM	Micromolar
WHO	World Health Organization
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

Nos últimos anos, os importantes avanços científicos e tecnológicos na área médica proporcionaram um considerável aumento na expectativa de vida (DIAS, et al., 2013). No entanto, as DTNs ainda causam um impacto na saúde de milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2008). As DTNs representam um grupo de 17 doenças que em sua maioria são transmitidas por insetos vetores ou por água e solo contaminados com formas infectantes de parasitos, de modo que se caracterizam por prosperar, especialmente em regiões pobres de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2010; MOLYNEUX, 2013).

A maior parte das patologias pode ser prevenida e eliminada, contudo, alterações ambientais causadas principalmente por ações humanas, aumentam a exposição a vetores e vulnerabilidade às infecções tropicais (MANDERSON et al., 2009). Além disso, a população afetada é dependente de políticas instáveis com sistemas de saúde precários que são incapazes de proporcionar recursos financeiros para apoiar a implementação de programas em saúde pública efetivos (MOLYNEUX, 2013).

Recentemente, uma grande parceria pública e privada foi firmada por um acordo denominado como Declaração de Londres que pretende controlar ou erradicar dez DTNs até o final da década (WHO, 2013; THE LANCET, 2014). Os compromissos propostos abrangem principalmente, amplo fornecimento de medicamentos aos países endêmicos e investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias (WHO, 2013; THE LANCET, 2014). Porém, é importante ressaltar que os medicamentos atualmente disponíveis para as DTNs são limitados, além de apresentarem alta toxicidade e baixa eficácia (NWAKA et al., 2009).

O cenário atual é consequência do baixo interesse das indústrias farmacêuticas na produção de novos fármacos, o que reflete no número extremamente reduzido de medicamentos que chegaram ao mercado ao longo das últimas décadas (MANDERSON et al., 2009; DIAS, et al., 2013). Dados revelam que dos 756 novos fármacos aprovados entre 2000 e 2011, apenas 3,6% foram destinados às DTNs (DIAS, et al., 2013; MSF, 2014). No entanto, o progresso no tratamento dos pacientes surgiu apenas do reaproveitamento dos medicamentos disponíveis para essas doenças e não do desenvolvimento de novas entidades químicas (NEQs) (MSF, 2014). As doenças causadas por protozoários e transmitidas por insetos como, Tripanossomíase humana africana, Leishmaniose e a doença de Chagas são

consideradas extremamente negligenciadas, pois representam as DTNs que menos receberam investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (BOCHARIE et al., 2013).

Apesar dos importantes avanços na prospecção de vacinas para DTNs causadas por protozoários, muitos dos candidatos apresentam-se apenas em fase inicial de estudo (QUIJANO-HERNANDEZ, DUMONTEIL, 2011; BEAUMIER et al., 2013). É importante relatar que o processo de produzir uma vacina pode levar muitos anos, pois se apresenta como um processo extremamente complexo e dispendioso (BEAUMIER et al., 2013). Portanto, estes dados revelam a urgência e importância de investimentos em pesquisas que visam à descoberta de novas ferramentas terapêuticas que possam promover um tratamento eficaz e mais breve para o tratamento dos acometidos por essas doenças.

1.2 Doença de Chagas

Inúmeras doenças têm sido classificadas como emergentes ou re-emergentes, pois a incidência em humanos aumentou nas últimas duas décadas ou ameaça aumentar no futuro próximo, visto que apresentam potencial de propagar-se por regiões não endêmicas (MACKEY, LIANG, 2012). Esse panorama é resultado principalmente da migração internacional e da rápida urbanização que proporcionam situações favoráveis para a difusão de doenças (COURA, VIÑAS, 2010).

A doença de Chagas é considerada uma doença re-emergente e tem recebido evidência mundial pelos relatos de casos em países não-endêmicos (BONNEY, 2014). Estima-se que 14 milhões de pessoas em países endêmicos emigraram para inúmeros países, o que favoreceu o aumento das infecções nos Estados Unidos e ao surgimento de casos no Canadá, em países da Europa e do Pacífico ocidental (SCHMUNIS, YADON 2010; COURA, VIÑAS, 2010; BONNEY, 2014). A patologia é característica de 21 países do continente americano e atualmente, atinge aproximadamente 8 milhões de pessoas (WHO, 2013).

A Doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909 quando o médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1878-1934) identificou o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* como agente causador da doença (RASSI et al., 2010). Posteriormente, o médico determinou todos os aspectos da doença, como as manifestações clínicas, patogenia, epidemiologia e ciclo evolutivo (CHAGAS, 1909).

O ciclo biológico do *T. cruzi* (Família: Trypasonomatidae, Ordem: Kinetoplastida) é heteroxênico, onde o parasito multiplica-se no meio intracelular do hospedeiro vertebrado mamífero e no meio extracelular do inseto vetor Triatomíneo (RASSI et al., 2010;

CLAYTON, 2010). Dessa forma, o parasito apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, entre eles estão: a forma epimastigota e tripomastigota metacíclica, presentes no tubo digestivo do inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas presentes no hospedeiro vertebrado (ANDRADE, ANDREWS, 2005; CLAYTON, 2010).

Sucintamente, o inseto hematófago entra em contato com o sangue de mamíferos infectados e obtêm as formas tripomastigotas sanguíneas que migram para o estômago do inseto, transformando-se em epimastigotas (CLAYTON, 2010). As formas epimastigotas reproduzem-se no intestino médio dos insetos por fissão binária e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Essas formas migram para o intestino posterior e reto do inseto e são finalmente, liberadas com as fezes e a urina durante um novo repasto sanguíneo (RASSI et al., 2010; CLAYTON, 2010).

Através da solução de continuidade da pele e mucosas, os tripomastigotas metacíclicos invadem principalmente macrófagos locais e fibroblastos e transformam-se em amastigotas. (RASSI et al., 2010). As formas amastigotas efetuam sucessivas divisões binárias de forma a ocupar todo o citoplasma celular. Posteriormente, elas modificam-se em tripomastigotas, que após romperem a membrana plasmática difundem-se através da corrente sanguínea e linfática infectando outras células, com especial tropismo pelas células musculares cardíacas. O ciclo natural da doença de Chagas torna-se completo quando as formas tripomastigotas sanguíneas são novamente ingeridas por um Triatomíneo (RASSI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011).

Figura 1. Ciclo simplificado de transmissão do *T. cruzi* (Vinício Ribeiro, FIOCRUZ, 2008)

A transmissão vetorial ainda representa o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas (RASSI et al., 2010). Os triatomíneos são naturalmente encontrados em ninhos de aves, tronco de árvores ou tocas de mamíferos e quando se apresentam como reservatórios do *T. cruzi*, transmitem o protozoário a diferentes mamíferos silvestres (COURA, DIAS, 2009). Os marsupiais e roedores têm especial importância epidemiológica, pois apresentam altas taxas de infecção e sinantropia, de modo a estabelecer uma ligação entre os ciclos silvestre e domiciliar da doença de Chagas (COURA, DIAS, 2009; RASSI et al., 2010; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012).

Algumas espécies de Triatomíneos são capazes de migrar para ambientes domiciliares e peridomiciliares (fendas em casas de barro, madeira, galinheiros, paióis), o que aumenta a proximidade com possíveis hospedeiros, como cães e gatos, e principalmente o homem (COURA, VIÑAS, 2010; RASSI, 2010; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012). É importante ressaltar que os seres humanos foram acidentalmente inseridos no ciclo biológico do parasito,

após a colonização de ambientes silvestres (COURA, VIÑAS, 2010; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012).

Inicialmente, o *Triatoma infestans*, um artrópode popularmente conhecido como “Barbeiro”, foi considerado o principal vetor da doença de Chagas. No entanto, desde 1979 inúmeros esforços entre países do Cone Sul concentraram-se na eliminação da transmissão por este vetor, o que proporcionou uma redução em 70% da incidência de novas infecções por *T. cruzi* em todo o continente (SCHOFIELD, DIAS, 1999; MONCAYO, 2003). Apesar disso, a interrupção da transmissão vetorial da doença no Brasil ocorreu apenas para a espécie *Triatoma infestans* (ARGOLO et al., 2008; ABAD-FRANCH et al., 2013; LAZZARI et al., 2013).

Outras espécies de importância epidemiológica incluem *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma brasiliensis* (ARGOLO et al., 2008). Porém, atenção especial deve ser dada ao inseto adulto *Rhodnius spp* que está amplamente distribuído entre diversos países endêmicos e exibe-se como um importante mecanismo subjacente à transmissão da doença de Chagas, seja pela infecção endêmica ou sobre a forma de surtos ligados à contaminação de alimentos (ARGOLO et al., 2008; ABAD-FRANCH et al., 2010; ABAD-FRANCH et al., 2013; LAZZARI et al., 2013).

Na ausência ou diminuição de vetores naturais outras formas de transmissão são possíveis, dentre elas: a transfusão sanguínea (bancos de sangue sem triagem específica), congênita (apenas na forma aguda, através da placenta), acidental (acidentes em laboratórios), oral (ingestão de alimentos e bebidas contaminados) e transplantes (RASSI et al., 2010, 2012).

A transmissão por transfusão sanguínea tem recebido destaque devido à infecção relacionada à emigração (SCHMUNIS, 2007; COURA, DIAS, 2009; CLAYTON, 2010). Normalmente, residentes sul-americanos infectados, que muitas vezes são inconscientes da condição patológica, migram para países desenvolvidos que não possuem triagem específica em bancos de sangue e possibilitam a disseminação da doença de Chagas quando se tornam doadores de sangue (SCHMUNIS, 2007; COURA, DIAS, 2009; RASSI, et al., 2010).

Nos últimos anos, a transmissão oral tem sido discutida pelos surtos de casos veiculados por alimentos e ingestão de bebida contaminada com fezes do triatomíneo (CLAYTON, 2010). Em 2010, foram notificados casos da doença de Chagas na Venezuela, onde 103 crianças infectadas e uma morte foram relatadas, após o consumo de suco de goiaba contaminado (DE NOYA et al., 2010). O fruto da palmeira açaí é outra fonte comum de

contaminação na Região Norte e alguns estados no Nordeste, pois o alimento é frequentemente consumido *in natura* (CLAYTON, 2010).

Através das características clínicas do indivíduo infectado por transmissão vetorial, a doença de Chagas pode apresentar a fase aguda e a fase crônica (RASSI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011). Na maioria dos indivíduos, a infecção aguda é assintomática, porém o hospedeiro pode apresentar uma resposta inflamatória na porta de entrada do parasito, conhecido como chagoma de inoculação e o sinal de Romanã (edema bipalpebral), que são clinicamente perceptíveis pela presença de edema local (RASSI et al., 2010). Ainda, outras manifestações clínicas são relatadas como: febre, linfadenopatia, mal-estar e hepatoesplenomegalia, de modo que, casos fatais são possíveis, quando ocorrem alterações cardíacas ou encefalomielite, principalmente em pacientes imunodeprimidos e crianças (EBRAHIM, 2004; ANDRADE, ANDREWS, 2005; RASSI et al., 2010).

A fase aguda é característica pela alta parasitemia e parasitismo tissular, que em pacientes imunocompetentes, regride em um ou dois meses pela ação da resposta imune dirigida ao parasito (RASSI et al., 2010). Com a redução das formas tripomastigotas do sangue, inicia-se um período indeterminado da doença, onde a maioria das pessoas permanece sem quaisquer sintomas clínicos e muitas vezes, desconhecem a presença da infecção chagásica (GOMES et al., 2009). Porém, em um período de 10 a 25 anos pós-contágio, parte dos infectados desenvolve uma fase sintomática, representada por patologias no sistema cardiovascular e/ou digestório (ANDRADE, ANDREWS, 2005; RASSI et al., 2010, 2012).

O comprometimento cardíaco é a forma clínica mais expressiva da doença de Chagas, principalmente por sua alta morbimortalidade (ANDRADE, ANDREWS, 2005). Observa-se um processo inflamatório predominantemente miocárdico, o que resulta em uma miocardite fibrosante evolutiva com comprometimento do processo de formação do estímulo cardíaco (RASSI et al., 2010; FERNANDES, ANDREWS, 2012). Tais danos geram anormalidades como, arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita, de modo que esse último ocorre na maioria dos casos (RASSI et al., 2010, 2012).

As complicações digestivas são caracterizadas pela dilatação do esôfago e colón, em consequência de lesões do sistema nervoso entérico, principalmente pela desnervação no plexo mioentérico de Auerbach (TEIXEIRA, 2011; RASSI et al., 2012). A desnervação induz à perda de coordenação motora e consequentemente, na acalasia dos esfíncteres, o que resulta no quadro patológico de megaesôfago e megacólon (RASSI et al., 2012).

A prevalência e a gravidade das diferentes formas clínicas da doença de Chagas estão especialmente relacionadas à extensa diversidade genética das cepas de *T. cruzi*, além da

resposta imunológica e constituição genética do hospedeiro vertebrado (ANDRADE, ANDREWS, 2005; TEIXEIRA et al., 2011; FERNANDES, ANDREWS, 2012). É importante relatar que apesar do desenvolvimento de uma forte resposta imunológica durante a fase aguda da infecção, o parasito não é totalmente eliminado, de modo que a persistência do *T. cruzi* ao longo de muitas décadas está intrinsecamente ligada à capacidade do parasito de invadir células distintas e ainda, das diferentes formas evolutivas adaptarem-se a condições específicas, a fim de driblar a resposta imune do hospedeiro (MANOEL-CAETANO, SILVA, 2007; MORTARA et al., 2008; FERNANDES, ANDREWS, 2012).

1.3 Quimioterapia da doença de Chagas

Há mais de 40 anos, os compostos nifurtimox e benzonidazol são as únicas terapias disponíveis para a doença de Chagas (MANARIN et al., 2013). Diversos estudos clínicos demonstraram que ambas as drogas apresentam atividade farmacológica significativa quando administradas na fase aguda e infecção congênita, cujos índices de cura são expressivos (URBINA, DOCAMPO et al., 2003; MARIN-NETO et al., 2009; URBINA, 2010). Entretanto, apesar de benefícios clínicos também serem relatados durante o tratamento na fase crônica, o uso dos compostos tem eficácia comprovada apenas no período inicial dessa fase, principalmente em crianças com sorologia positiva (ESTANI, 1998; MARIN-NETO et al., 2008, 2009; URBINA, 2010; DIAS et al., 2014).

Ambos os fármacos pertencem ao grupo de compostos nitroheterocíclicos que geralmente funcionam como pró-fármacos, ou seja, devem sofrer bioativação para produzir metabolitos ativos (PAULINO et al., 2005). Os compostos são ativados pela família de Flavoproteínas nitroredutases do tipo I, que são responsáveis pela redução do grupo nitro (NO_2) ligados ao anel aromático em ambos compostos. A redução produz intermediários reativos e/ou metabólitos eletrofílicos que causam efeitos tóxicos ao parasito (PAULINO et al., 2005; CASTRO et al., 2006, URBINA, 2010).

Figura 2. Estrutura química do nifurtimox e benzonidazol.

A ação tripanocida do nifurtimox deve-se a reação dos radicais nitroânion com o oxigênio, que resulta na produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DOCAMPO, 2001). *T. cruzi* é deficiente de mecanismos de detoxificação, o que o torna mais susceptível à ação destes compostos (DOCAMPO, STOPPANI, 1979; MORELLO, 1988; DOCAMPO, 2001). Por outro lado, o mecanismo de ação do benzonidazol está associado à ligação covalente dos intermediários nitro reduzidos a macromoléculas do *T. cruzi*, tais como DNA e citocromo P450 (URBINA, DOCAMPO, 2003). É descrito ainda que o benzonidazol aumenta a fagocitose e lise do parasito através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN- γ), além de inibir o crescimento do *T. cruzi* via bloqueio da enzima NADH-furamato redutase (DE TORANZO, 1988; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Contudo, os metabólitos resultantes da ação dos compostos podem causar efeitos tóxicos aos tecidos do hospedeiro e provocar diversos efeitos colaterais que muitas vezes, provocam a suspensão do tratamento (CASTRO et al., 2006). Os efeitos secundários mais frequentes para o uso do benzonidazol são as manifestações cutâneas (hipersensibilidade e dermatite com erupções cutâneas), anorexia, perda de peso, vômitos e alterações psíquicas além de edema generalizado, dor muscular e articular. Depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose representam as manifestações mais graves (URBINA, DOCAMPO, 2003; CASTRO et al., 2006; RASSI et al., 2012). Para o uso do nifurtimox foram relatados: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas e manifestações digestivas, tais como náuseas ou vômitos. O uso desse composto é contraindicado em pacientes com doenças renais, hepática grave e gravidez (URBINA, DOCAMPO, 2003; CASTRO et al., 2006). Dessa forma, devido aos importantes efeitos tóxicos associados ao uso do nifurtimox o fornecimento do composto foi interrompido na maioria dos países, inclusive o Brasil (MARIN-NETO et al., 2009)

É importante relatar que a outra importante limitação para ambos os compostos reside especialmente na baixa atividade antiparasitária durante a fase crônica, pois é a forma mais prevalente e patologicamente importante da doença de Chagas (MARIN-NETO et al., 2010; RASSI et al., 2010). É descrito na literatura que a frequência de casos refratários ocasionados por parasitos resistentes contribuem para as baixas porcentagens de cura detectadas em pacientes tratados. Além disso, a grande variabilidade genética e distribuição geográfica das populações do *T. cruzi* podem interferir na eficácia terapêutica da doença de Chagas (DE TORANZO, 1988; URBINA, DOCAMPO, 2003; BONNEY, 2014).

Recentemente, dificuldades tem sido apresentadas em relação a produção e distribuição do benzonidazol. No início de 2008, o composto começou a ser produzido no Brasil após a empresa Roche anunciar o fim da produção, devido ao baixo retorno financeiro da venda do produto (DIAS et al., 2014). O Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) tornou-se então, o único produtor mundial do benzonidazol, porém, o recente aumento da demanda, principalmente por países não-endêmicos, resultou na dificuldade de produção e distribuição do composto, de modo que parte da produção foi transferida ao Laboratório Endocrínico da Argentina (ELEA) (DIAS et al., 2014; MSF, 2014). É importante reforçar que apesar do benzonidazol apresentar considerável eficácia para o tratamento em crianças, o medicamento adaptado para uso infantil foi produzido apenas no ano de 2011 (DIAS et al., 2014).

Diante dos dados apresentados, observa-se a extrema necessidade de estudos relativos à descoberta de novos fármacos, os quais estão especialmente direcionados na determinação de alvos presentes em vias metabólicas importantes do parasito (URBINA, DOCAMPO, 2003; RASSI et al., 2012). No entanto, nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com atividade contra o *T. cruzi*. Desse modo, é de fundamental importância determinar a atividade biológica e compreender os mecanismos de ação desses compostos sobre estruturas importantes do parasito, para que futuramente possam substituir de forma ativa as terapias convencionais e pouco eficazes da doença de Chagas.

1.4 Atividade biológica dos terpenos

A evolução da história a partir da existência humana sempre esteve intrinsecamente associada ao uso de recursos naturais (GURIB-FAKIM, 2006). Minerais, vegetais, fungos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e foram amplamente utilizados por milhares de anos, principalmente no tratamento de doenças (RATES, 2001; BARREIRO, BOLZANI, 2009). Entre essas fontes, os vegetais foram historicamente um dos mais importantes, particularmente porque constituíram a base da terapia medicamentosa até início do século XIX, quando o desenvolvimento da química orgânica proporcionou a obtenção do princípio ativo de plantas e consequentemente, a produção de compostos sintéticos (CORDELL, 2000; BALUNAS, KINGHOR, 2005; HALLER, 2008).

Nas últimas décadas, os métodos espectroscópicos aliados às técnicas de extração, como a cromatografia, contribuíram substancialmente na obtenção e caracterização de

numerosos compostos naturais (GURIB-FAKIM, 2006). Diversas semelhanças estruturais entre essas substâncias apresentam-se como fontes altamente relevantes para a descoberta de drogas, além de prováveis materiais de partida para novos compostos sintéticos (CORDELL, 2000; BALUNAS, KINGHOR, 2005; CLARDY, WALSH, 2004; KOEHN, CARTER, 2005; GURIB-FAKIM, 2006). É importante ressaltar que os produtos naturais e os derivados naturais ou sintéticos representam a maioria dos medicamentos em uso clínico no mundo, de modo que grande parte é representada por produtos do metabolismo secundário de plantas superiores (NEWMAN et al., 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

As plantas vasculares produzem uma variedade de compostos químicos a partir de metabólitos primários e secundários (PICHESKY, GANG, 2000). O metabolismo primário está relacionado a funções básicas de sobrevivência da planta, enquanto o metabolismo secundário consiste na produção de compostos químicos não necessários à sobrevivência imediata, mas contribuem amplamente para a interação das plantas com o ecossistema (BOURGAURD et al., 2001). Particularmente, os metabólitos secundários produzidos para conferir proteção contra a ação de patógenos são considerados de grande importância na medicina, principalmente por compreender substâncias com aplicabilidade terapêutica em seres humanos (BOURGAURD et al., 2001; THEIS, LERDAU, 2003; GURIB-FAKIM, 2006; PADUCH et al., 2007).

De acordo com a via de biossíntese, os compostos secundários de plantas são classificados em três grandes famílias que compreendem compostos alcaloides, fenólicos e terpenos (BOURGAURD et al., 2001; PADUCH et al., 2007). Com mais de 20.000 metabólitos identificados, os terpenos representam a classe mais diversificada de produtos naturais encontrados em plantas (THOLL, 2006; PADUCH et al., 2007). Essas substâncias são constituídas basicamente por hidrocarbonetos, porém, frequentemente são encontradas estruturas ligadas a grupos funcionais que contém oxigênio, conhecidos como terpenóides (PADUCH et al., 2007).

Os terpenos são definidos como metabólitos estruturalmente formados por unidade de isoprenos (C_5H_8) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do isopreno

Sucintamente, a ação de diferentes enzimas resulta na ligação das unidades de isoprenos e formação da estrutura básica dos monoterpenos (duas unidades de isopreno), sesquiterpenos (três unidades de isopreno) ou diterpenos (quatro unidades de isopreno). Diferentes reações químicas como oxidação, redução, isomerização são responsáveis pela produção da grande variedade dos terpenos encontrados na natureza (THOLL, 2006; PADUCH et al., 2007; LANGE, AHKAMI, 2013).

Os terpenos possuem diversas aplicabilidades na cosmetologia e como inseticidas, porém os efeitos terapêuticos são os mais relevantes (THOLL, 2006). Diversos trabalhos relatam a atividade desses compostos como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, antialérgicos, antiespasmódico, anti-inflamatório, imunomoduladores, além dos efeitos na prevenção e terapia de diversos tipos de câncer (BARDON et al., 2002; PEANA et al., 2003, PADUCH et al., 2007). Uma variedade de terpenos e seus derivados sintéticos têm sido descritos ainda, como agentes antiparasitários com alta eficácia e seletividade especialmente pela ação leishmanicida, antimalárica e tripanocida (ARAYA et al., 2003; KAYSER et al., 2003; MAYA et al., 2007; CUNHA et al., 2003; GERSHENZON, DUDAREVA, 2007; FERREIRA et al., 2010; ABDEL-SATTAR et al., 2010; OTOGURO et al., 2011. IZUMI et al., 2013)

O sesquiterpeno Artemisinina e seus derivados representam uma classe potente de antimaláricos amplamente utilizados em todo o mundo (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003; KAYSER et al., 2003). Isolado da planta *Artemisia annua* L., o composto possui uma função de endoperóxido que sofre redução pela interação com o Fe (II) e os produtos resultantes da reação, inibem a enzima cálcio ATPase (adenosine triphosphatase) do retículo sarcoplasmático do parasito que ocasiona drástica redução da parasitemia (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003; KAYSER et al., 2003; PADUCH et al., 2007; GERSHENZON, DUDAREVA, 2007).

Figura 4. Estrutura química da Artemisinina

Nos últimos quinze anos, a perspectiva de desenvolvimento de novas drogas contra o *T. cruzi* conduziu a triagem de centenas de espécies de plantas (IZUMI et al., 2011). Diversos

são os trabalhos da literatura que relatam a atividade de terpenos contra as diferentes formas evolutivas do parasito, de modo que importantes resultados foram obtidos entre compostos sesquiterpenos e diterpenos (BATISTA et al., 1999; UCHIYAMA et al., 2002; SHIMIDT et al., 2002; KAYSER et al., 2003; ARAYA et al., 2003; MENDOZA et al., 2003; UCHIYAMA et al., 2003, 2005, 2006; UCHIYAMA, 2009; SHIMIDT et al., 2009; KARIOTI et al., 2009; PELIZZARO-ROCHA et al., 2010; SHIMIDT et al., 2011)

Schmidt et al. (2009), avaliaram os efeitos de quarenta lactonas sequiterpenos isoladas de diversas espécies, contra as formas amastigotas do *T. cruzi* e identificaram resultados relevantes para a maioria dos compostos, com destaque para sete isolados de espécies de *Arnica*, que inibiram 50% dos parasitos em concentrações inferiores a 7 μ M.

Diterpenos característicos dos gêneros *Azorella* e *Mulinum* (Apiaceae) foram testados contra três diferentes cepas e sobre todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, de modo que os compostos azorellanol e o ácido mulin-11,13-dien-20-oic apresentaram forte atividade em baixas concentrações em todas as formas evolutivas do parasito (ARAYA et al., 2003). Mendoza et al. (2003), avaliaram cinco diterpenos isolados de *Myrospermum frutescens*, onde quatro apresentaram alta atividade contra epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*,

É importante ressaltar que apesar de amplamente distribuídos na natureza, o mecanismo molecular da ação dos terpenos é pouco conhecido (GERSHENZON, DUDAREVA, 2007; IZUMI et al., 2012). A natureza altamente lipofílica de muitos destes compostos sugere que o alvo principal é a membrana celular, especificamente os transportadores de íons responsáveis pelo equilíbrio osmótico das células dos patógenos (INOUE et al., 2004; GERSHENZON, DUDAREVA, 2007; IZUMI et al., 2012).

1.5 Oleorresina de copaíba e constituintes com atividade farmacológica

Popularmente conhecidas como copaíbas ou copaíberas, as árvores do gênero *Copaifera* (família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*) estão amplamente distribuídas na região tropical da America Latina e África Ocidental (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; LEANDRO et al., 2012). As copaíbas possuem especial importância devido à produção de um oleorresina, que exsuda do tronco ferido, denominado óleo de copaíba (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002). O óleo procede de canais secretores (esquizógenos) localizados em todas as partes da árvore, que são importantes na desintoxicação do organismo vegetal e na defesa contra a ação de animais e patógenos (Martins-da-Silva, 2008). Há mais de vinte espécies que ocorrem no Brasil, com destaque para espécie *C. langsdorfii* Desf. que é particularmente

importante por estar distribuída por todo o território brasileiro (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; MARTINS-DA-SILVA et al., 2008).

O Brasil hospeda uma expressiva parte de toda biodiversidade mundial (BARREIRO, BOLZANI, 2009). Essa característica aliada à proximidade das populações com áreas florestais favoreceu a exploração dos potenciais terapêuticos de inúmeras plantas, cujos conhecimentos de aplicação foram amplamente difundidos de maneira empírica durante centenas de anos pela conhecida medicina popular (PIERI et al., 2009).

A chegada dos europeus ao Brasil no século XVI possibilitou o conhecimento de que as propriedades medicinais do oleorresina já eram bastante difundidas entre os índios latino-americanos (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; PIERI et al., 2009; GARCIA, YAMAGUCHI, 2012). Desse modo, o uso do óleo para fins medicinais tem sido passado de geração em geração até os dias atuais, o que é fortemente evidenciado na região amazônica, onde o produto é comercializado tanto em feiras livres como em lojas de produtos naturais para uso oral ou tópico (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002, PIERI et al., 2009). Na região, o oleorresina é popularmente indicado para inúmeras doenças, principalmente: gonorreia, bronquite, dores em geral, psoríase, asma, feridas, infecções uterinas, inflamações em geral, doenças do aparelho digestivo e câncer (DE MELLO, 1980; CASCON, CARVALHO, 2004; ALBUQUERQUE et al., 2007; COELHO-FERREIRA, 2009; SANZ-BISET et al., 2009; VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados a fim de se confirmar cientificamente essas propriedades medicinais e validar a utilização generalizada do oleorresina de copaíba (PIERI et al., 2009; LEANDRO et al., 2012). Assim, diversos autores desenvolveram diferentes experimentos que corroboraram as atividades farmacológicas do oleorresina, tais como, ação anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana, antifúngica, leishmanicida e contra *T. cruzi*. Além disso, o óleo também foi avaliado para o tratamento de úlcera, doenças de pele e câncer (PAIVA et al., 1998, 2002; VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; TINCUSI et al., 2002; LIMA et al., 2003; CASTRO-E-SILVA et al., 2004; CARVALHO et al., 2004, 2005; MAISTRO et al., 2005; VEIGA JUNIOR, 2006, 2007; OLIVEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2008b; GOMES et al., 2008; PIERI et al., 2009; DEUS et al., 2009; MENDONÇA, ONOFRE, 2009; IZUMI et al., 2013)

Certamente, a atividade antimicrobiana é uma das propriedades mais avaliadas (LEANDRO et al., 2011). Um estudo demonstrou a atividade do oleorresina extraído das espécies *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata*, contra bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas. O óleo foi ativo apenas contra espécies Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, cujo valor de IC₅₀ esteve entre 31,3-62,5 µg/mL. Os resultados da análise sobre o mecanismo de ação sugerem que o oleorresina pode atuar na parede celular das bactérias (SANTOS et al., 2008a).

Santos et al. (2008b) analisaram o oleorresina de oito diferentes espécies de *Copaifera* e demonstrou que todos apresentaram atividade significativa contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com um valor de IC₅₀ entre 5 a 22 µg/mL. Posteriormente, o mesmo grupo publicou um estudo de infecção por *L. amazonensis* *in vivo*, o qual demonstrou a capacidade do oleorresina em reduzir significativamente o tamanho de lesões promovidas pelo parasito, sem causar efeitos deletérios às células do hospedeiro (SANTOS et al., 2011).

Izumi et al. (2012) avaliaram o efeito do oleorresina de copaíba extraído de diferentes espécies de *Copaifera* sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*. Os resultados obtidos comprovaram que os isolados foram ativos em todos os estágios de vida do parasito, particularmente sobre as formas replicativas. As formas amastigotas foram mais suscetíveis após 96 h de tratamento, de modo que na concentração de 5,0 µg/ml o oleorresina de *C. martii* e *C. officinalis* causou a inibição de 99% das formas do *T. cruzi*. Todos os tratamentos causaram alterações simultâneas na permeabilidade da membrana celular e mitocondrial, o que provavelmente ocasionou a lise do parasito.

Em uma breve análise de alguns artigos publicados é possível observar que diferenças importantes são obtidas nos ensaios biológicos com oleorresina extraído de diferentes espécies de *Copaifera*. Esse fato se deve especificamente pela composição química do óleo, que se apresenta por uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). A quantidade de óleo produzida depende da espécie, das características genéticas da planta, do tipo de solo, da disponibilidade de água e da época do ano (VEIGA-JUNIOR et al., 2002, 2005). Todos esses fatores influenciam diretamente na densidade, viscosidade, coloração e composição química do oleorresina (LANGENHEIM, 2003; GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Para as espécies de *Copaifera*, os sesquiterpenos são os compostos mais abundantes e responsáveis pelo aroma típico do óleo (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002, LEANDRO et al., 2012). Os sesquiterpenos mais relatados na literatura estão α -copaeno, β -humuleno, α -cubebeno, β -cariofileno, óxido de cariofileno entre outros. Devido a grande semelhança estrutural, alguns autores relatam que o óxido de cariofileno pode ser obtido facilmente através da oxidação do β -cariofileno, seja por um processo natural durante a armazenagem do

oleorresina ou produzido por reações de síntese (CASCON, GIBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

Figura 5. Estrutura química do óxido β -cariofileno e óxido de cariofileno

Os principais diterpenos presentes na parte resinosa são ácido hardwíckiico, ácido clorequínico, ácido covalênico, ácido caurenóico e ácido copálico (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; MACIEL et al., 2002). O ácido copálico é considerado uma marca química das copaíbas, pois representa uma substância comum na maioria das análises de identificação do oleorresina (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

Figura 6. Estrutura química do diterpeno ácido copálico

Estudos com produtos naturais geralmente envolvem processos cromatográficos, que proporcionam a obtenção e caracterização de compostos (RATES, 2001; IZUMI et al., 2012). O fracionamento por métodos cromatográficos apresenta-se como um método útil e extensivamente utilizado, embora seja importante relatar que a obtenção de um único composto pode ser um processo difícil e que na maioria das vezes, resulta da aplicação de diferentes métodos e análises (RATES, 2001).

É possível encontrar muitos estudos que relatam a atividade farmacológica de alguns terpenos mais comumente encontrados em oleorresina de plantas. Tung et al. (2008) verificaram a atividade anti-inflamatória do óleo essencial e dos principais compostos isolados de *Cinnamomum osmophloeum*. Neste estudo, os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno exibiram excelente atividade anti-inflamatória através da supressão da produção de óxido nítrico por macrófagos estimuladas com LPS (Lipopolissacarídeo). Outro estudo relatou que ambos os compostos isolados de *Aegle marmelos* podem induzir a

apoptose em células de linfoma e de neuroblastoma (SAIN et al., 2014). Goren et al. (2011) relataram que β -cariofileno apresentou atividade para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O óxido cariofileno apresentou atividade apenas contra *C. albicans*.

Nos últimos anos, a busca por novos compostos para as doenças tropicais causadas por protozoários tem se intensificado e a avaliação dos isolados de plantas tem demonstrado as suas potencialidades terapêuticas sobre as formas evolutivas de tripanosomatídeos (SOUZA-BRITO, 1993; ALVES et al., 2000, IZUMI et al., 2011, 2012; POLANCO-HERNÁNDEZ et al., 2013). No entanto, apesar das de inúmeras espécies vegetais terem sido avaliadas nos últimos quinze anos, pouco mais de 100 compostos foram realmente isolados e estudados (IZUMI et al., 2011)

Embora o ácido copálico seja um marcador biológico comum a todos os óleos de copaíba, há poucos trabalhos na literatura que avaliaram a atividade desse diterpeno. No entanto, Satorelli et al. (2010) demonstraram que o ácido copálico é ativo contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e, aproximadamente três vezes mais eficaz do que o benzonidazol, usado como padrão de tratamento em pacientes chagásicos. Porém, o diterpeno apresentou toxicidade moderada para células de mamíferos e em concentrações elevadas, causou hemólise em eritrócitos de camundongos.

Izumi et al. (2012) verificaram a atividade tripanocida de oito terpenos comumente encontrados em oleorresinas de copaíba. O ácido copálico e o β -cariofileno apresentaram importante atividade contra as formas epimastigotas, com valores de IC₅₀ de 42,7 e 78,4 μ M, respectivamente. Todos os terpenos avaliados apresentaram melhor efeito farmacológico para as formas amastigotas, de modo que o ácido copálico foi o composto mais ativo por causar inibição de 50% das formas na concentração de 1.3 μ M. Além disso, o composto ácido copálico e β -cariofileno apresentaram forte atividade sinérgica contra o *T. cruzi*.

É importante ressaltar, que a capacidade das plantas em sintetizar substâncias tóxicas que naturalmente agem na defesa contra diferentes patógenos, pode ainda ser citotóxica quando administrados no organismo humano (IZUMI et al., 2012). Assim, embora a atividade farmacológica do oleorresina e dos diversos terpenos seja expressiva, uma atividade hemolítica e citotóxica moderada tem sido relatada (COSTA-LOTUFO et al., 2002; IZUMI et al., 2012, SARTORELLI et al., 2010).

No entanto, os terpenos podem ter as estruturas químicas modificadas para melhorar a atividade parasitária e reduzir a toxicidade para o hospedeiro (MENEGATTI et al., 2001; DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010; HARAGUCHI et al., 2011; IZUMI et al., 2011). A

modificação química de produtos naturais constitui uma prática comum na produção de novos fármacos pela indústria farmacêutica, de modo que, além de avaliar a atividade dos compostos isolados, é de fundamental importância propor modificações estruturais dessas moléculas, a fim de reduzir a citotoxicidade e melhorar a atividade contra o *T. cruzi* (MENEGATTI et al., 2001; NEWMAN et al., 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

Sabe-se que a doença de Chagas ainda é considerada uma doença negligenciada e responsável por causar alto impacto social e econômico em países endêmicos. O baixo interesse das indústrias farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de novas terapias contribui para que essa patologia permaneça no grupo das DTNs. Desse modo, há mais de 50 anos as únicas terapias disponíveis baseiam-se no benzonidazol e o Nifurtimox, que são eficazes apenas no período inicial da doença, além de provocarem inúmeros efeitos colaterais. Portanto o presente trabalho fundamenta-se na importância e urgência de estudos dos compostos terpenos e na obtenção de derivados, especialmente aqueles que futuramente possam substituir de forma ativa as terapias convencionais e pouco eficazes da doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o potencial farmacológico *in vitro* de derivados semissintéticos, produzidos a partir dos terpenos óxido de cariofileno e ácido copálico, contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o diterpeno ácido copálico por métodos cromatográficos a partir do oleorresina de copaíba da espécie *Copaifera langsdorffii*.
- Realizar modificações estruturais a partir do óxido de cariofileno e ácido copálico para obter inúmeros derivados semissintéticos;
- Determinar a citotoxicidade das substâncias obtidas sobre células de mamíferos LLC-MK2;
- Determinar o potencial farmacológico das substâncias sobre as formas epimastigostas e tripomastigotas das cepas Bolívia e Y do protozoário *T. cruzi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fluxograma de execução dos experimentos

Didaticamente, as etapas de execução dos experimentos apresentadas no presente trabalho serão divididas em parte 1 (obtenção do ácido copálico) e parte 2 (obtenção de derivados semissintéticos do óxido de cariofileno).

3.2 Materiais utilizados nos processos de obtenção e análise dos compostos

Todos os solventes empregados nas reações de síntese foram tratados de acordo com a literatura (PERRIN et al., 1980). Os solventes utilizados nos processos cromatográficos foram de grau técnico, previamente submetido à destilação fracionada. As características das fases estacionárias utilizadas variaram de acordo com a separação desejada:

- Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizou-se sílica gel 60 GF₂₅₄, com espessura de 0,25 mm. Para a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizou-se sílica gel 60 PF₂₅₄ com gesso.

- Para a cromatografia em coluna clássica e coluna “flash” (média pressão) utilizou-se sílica gel 60 com granulometria 70-230 mesh (Merck). Ao longo do procedimento cromatográfico, os solventes utilizados foram adequadamente recuperados e os níveis de polaridade foram ajustados de acordo com a necessidade de eluição.

Os perfis cromatográficos obtidos por CCDC para as reações de síntese do óxido de cariofileno foram visualizados com o uso de agente revelador com solução ácida de vanilina e cuba preenchida com iodo. Os perfis cromatográficos obtidos por CCDC para os demais procedimentos foram visualizados com o uso de agente revelador com anisaldeído sulfúrico. De acordo com a necessidade, os perfis cromatográficos foram previamente analisados por irradiação no UV (254 e 366 nm).

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foram efetuadas em um cromatógrafo SHIMADZU - QP 2010 equipado com coluna DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Agilent Technologies), modo de ionização de impacto de elétrons, temperatura de injetor a 250 °C e hidrogênio como gás de arraste, com variação de temperatura de 100° a 280 °C.

As análises de cromatografia em fase gasosa (CG) realizadas para os derivados semissintéticos do óxido de cariofileno foram efetuadas em um cromatógrafo SHIMADZU-GC 2014 equipado com coluna RTX-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA), detector de ionização de chama (FID) e nitrogênio como gás de arraste, com variação de temperatura de 80 °C a 250 °C, com acréscimo de 10 °C/min.

As análises realizadas através do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa foram obtidas em um sistema cromatográfico Agilent 6890 Series, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-1 (17,0 mm x 0,2 mm x 0,11 µm de espessura de filme) e um injetor automático 7683 com controle eletrônico de pressão e interfaciado com um detector de massas Agilent 5973. Temperaturas de operação do detector: linha de transferência, 280 °C; fonte iônica, 230 °C; interface, 280 °C; quadrupolo, 150 °C. Detecção por monitoramento seletivo de íons (SIM) com um tempo de varredura de 20 milissegundos. Ionização por impacto de elétrons a 75 eV. Condições de operação do cromatógrafo: injetor, 280°C; coluna, 180°C (temperatura inicial, 0 min); seguido de um gradiente de 3,0 °C/min até 229 °C/min (0 min) e 40 °C/min até a temperatura final de

310 °C (5,0 min); fluxo total, 18,4 mL/min; pressão, 16,0 psi; velocidade linear média, 38 cm/s; 1 µL de amostra injetada com divisão de fluxo na razão de 1:10.

As análises de RMN de ^1H a 400 MHz e RMN de ^{13}C a 100 MHz foram realizadas em um espectrômetro Bruker DRX-400 (Departamento de Química da FFCLRP). Os deslocamentos químicos estão descritos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), usado como padrão interno de referência. Dados estão expressos: deslocamento químico (δ); constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e integração. Todas as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o pico referente aos sinais do solvente em questão foram ajustados para 77,0 ppm.

3.3 Materiais utilizados para realização dos testes *in vitro*

Os ensaios biológicos foram realizados *in vitro* sobre linhagens de *Trypanosoma cruzi* com diferentes graus de patogenicidade, cepa Y (SILVA, NUSSENZWEIG, 1953) e cepa Bolívia (TAKEDA, PRADO JUNIOR, 1974). As linhagens foram repicadas semanalmente e mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), a 28 °C.

As células epiteliais de tecido renal de macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*), denominada LLC-MK2, foram obtidas comercialmente (ATCC® CCL-7™) e mantidas em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute). Uma linhagem celular de fibroblasto humano (CCD-1059SK, BCRJ 0061- passagem 13) foi obtida através do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Ambos os meios foram suplementados com 25 UI/mL penicilina, 25 µg/mL estreptomicina, 10% de SFB e as células foram mantidas sobre atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO_2 .

A ação citotóxica das substâncias e o teste de viabilidade de epimastigotas foram realizados pelo método do sal tetrazol MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. A viabilidade das formas tripomastigotas foi realizada pelo sal de tetrazol XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) em combinação com o composto PMS (Phenazine methosulfate).

3.4 Parte 1. Obtenção do ácido copálico

Parte dos experimentos para obtenção do ácido copálico foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) sobre orientação do Professor Dr.

Norberto Peporine Lopes e o Dr. João Paulo Barreto de Sousa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). No entanto, devido algumas dificuldades encontradas para obtenção do composto isolado, a sequência da etapa foi realizada sobre orientação do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos do laboratório de Farmacognosia da FCFRP.

3.4.1 Obtenção e análise do oleorresina de copaíba

O oleorresina de copaíba da espécie *Copaifera langsdorffii* foi adquirido comercialmente da Cooperiaco Cooperativa localizada em Sena Madureira, Acre. Uma alíquota do oleorresina foi submetida à análise por CG-EM.

3.4.2 Metodologia para obtenção da fração de diterpenos do oleorresina de copaíba

Uma coluna cromatográfica clássica (110 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro interno) foi empacotada com 1,7 kg de sílica gel e solvente hexano. Posteriormente, uma alíquota de 500 g do oleorresina de copaíba, adsorvida em uma porção de sílica gel, foi aplicada sobre a fase estacionária.

Os solventes n-hexano e acetato de etila (AcOEt) foram selecionados para eluição da coluna cromatográfica, em concordância com o perfil cromatográfico do oleorresina obtido por CCDC. Então, inicialmente foram coletadas frações de 1 L por meio da eluição da coluna com 100% de hexano. Posteriormente, um total de 100 frações de 500 mL cada, foram coletados através do gradiente crescente da polaridade pela combinação hexano:AcOEt. Após a obtenção das substâncias de interesse, aumentou-se a polaridade de eluição até atingir o ponto de limpeza da coluna. Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador sobre pressão reduzida e monitoradas por CCDC, de modo que, àquelas com perfis similares foram agrupadas com o intuito de obter frações purificadas e/ou substâncias puras.

As frações que apresentaram maior concentração de diterpenos foram separadas e submetidas à análise por CLAE e CG-EM. A fração, que será didaticamente chamada de fração 1 (FR1), foi selecionada para subfracionamento e obtenção do ácido copálico.

3.4.3 Cromatografia clássica em modelo de coluna curta (*short column model* - SCM)

Diferentes metodologias foram realizadas para obter o ácido copálico. A primeira metodologia foi elaborada pelo subfracionamento de FR1 por cromatografia clássica em

modelo de coluna curta (SCM, do inglês *short column model*). Basicamente, o modelo propõe a eluição dos compostos de interesse em uma coluna curta, empacotada por uma pequena quantidade de sílica gel (10 g de sílica para cada 1 g de amostra), conforme descrito por Souza et al., 2011.

Uma coluna cromatográfica clássica curta (23 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro interno) foi empacotada com 250 g de sílica gel e solvente hexano. Posteriormente, uma alíquota de 25 g de FR1, adsorvida em uma porção de sílica gel, foi aplicada sobre a fase estacionária. Foram obtidas 90 frações de 500 mL cada uma, de modo que as frações iniciais foram coletadas com 100% do composto apolar hexano, seguido do gradiente crescente da polaridade pela combinação hexano:AcOEt e por fim, 100% de AcOEt. Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador sobre pressão reduzida e monitoradas por CCDC e àquelas com perfis similares foram reunidas. Porém, as análises do perfil de CCDC e CG-EM das amostras potencias, demonstraram que a técnica não foi eficiente para obter o ácido copálico.

3.4.4 Extração ácido-base do oleorresina de copaíba

Uma segunda metodologia foi adotada através da extração ácido-base do oleorresina de copaíba, subsequente a uma reação de esterificação da fração ácida de interesse, de acordo com protocolo modificado de Nunes (1994). Uma alíquota de 46 g do oleorresina de copaíba foi dissolvida em 100 mL de éter etílico e transferida para um funil de separação. A esta solução foi adicionada 50 mL de KOH 5% e a mistura reacional foi agitada por aproximadamente 30 s. Aguardou-se a separação do produto em uma fase orgânica e fase aquosa, de modo que a fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi coletada em um béquer. O procedimento foi repetido quatro vezes e o volume final da fase aquosa foi acidificado com HCl concentrado até pH = 3 e transferido para o funil de separação. A esta solução foi adicionado 60 mL de éter etílico e a mistura reacional foi agitada por aproximadamente 30 segundos. Aguardou-se a separação do produto em uma fase aquosa e fase etérea, de modo que a fase aquosa foi descartada e a fase etérea foi coletada em um béquer. O procedimento foi repetido por quatro vezes e o volume final da fase etérea foi lavada com água até atingir pH = 7, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada em rotaevaporador sobre pressão reduzida. O procedimento resultou em 20 g de fração ácida.

Para reação de esterificação, uma mistura de 13,8 mL do reagente metanol em presença de cloreto de tionila (SOCl_2) foi adicionada sobre uma solução de 20 g da fração

ácida, 3,8g de NaOH e 77mL de água. A mistura reacional foi agitada por 20 min e permaneceu sobre refluxo por 1 hora e meia. Após este período, a fração esterificada foi adicionada no funil de separação, extraída com éter, lavada com água (3 x 50mL), seca com Na₂SO₄ e concentrada em rotaevaporador sobre pressão reduzida. Alíquotas da fração ácida antes e após a esterificação foram analisadas e comparadas por CCDC sobre revelação em anisaldeído sulfúrico. A amostra de interesse apresentou uma modificação do perfil cromatográfico em relação ao produto não esterificado.

Portanto, uma alíquota de 10g do produto final, adsorvida em uma porção de sílica gel, foi aplicada em uma coluna cromatográfica clássica SCM, empacotada com 100 g de sílica gel e solvente hexano, como descrito anteriormente. Foram obtidas 80 frações de 500 mL cada uma. As frações iniciais foram coletadas pela adição do composto apolar hexano 100% (frações 1 a 17), seguido ao aumento da polaridade com hexano:AcOEt na proporção de 99:1 (Frações 18 a 37), hexano:AcOEt na proporção de 98:2 (Frações 38 a 47), hexano:AcOEt na proporção de 95:5 (Frações 48-68) e AcOEt 100 % (69-80). As frações foram concentradas em rotaevaporador sobre pressão reduzida e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico por CCDC. No entanto, observou-se que todas as amostras ainda permaneciam em mistura de diterpenos. Embora, seja importante ressaltar que parte Fração V (Tabela 1), sofreu processo de cristalização após evaporação total do solvente em temperatura ambiente.

Tabela 1. Frações obtidas após cromatografia clássica SCM e frações resultantes da reunião das 80 frações de acordo com os padrões de CCDC. Parte da fração em destaque apresentou processo de cristalização em temperatura ambiente.

Frações resultantes	Frações reunidas
I	1-18
II	18-30
III	31-39
IV	40-48
V	49-52
VI	53-69
VII	69-80

O cristal formado foi lavado com hexano por três vezes, seco em temperatura ambiente, liofilizado e pesado, o que resultou em um produto final de 62 mg. Uma alíquota do produto foi analisada por CLAE e CG-EM e o resultado foi sugestivo de uma amostra com alto grau de pureza.

A fim de elucidar a estrutura desse produto, uma alíquota de 15 mg foi solubilizada em CDCl_3 e encaminhada para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Os resultados foram condizentes com a estrutura molecular do ácido 19-ent-cauranóico.

3.4.5 Obtenção do Ácido Copálico

Devido à dificuldade de obtenção do ácido copálico, uma terceira metodologia foi proposta. A FR1, concentrada em compostos diterpenos, foi submetida à cromatografia em coluna clássica (8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento) na proporção de 1g de amostra para 100 g de sílica gel.

Uma coluna cromatográfica clássica (100 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro interno) foi empacotada com 1,5 kg de sílica gel e solvente hexano. Posteriormente, uma alíquota de 15 g de FR1, adsorvida em uma porção de sílica gel, foi aplicada sobre a fase estacionária. Um volume de 200 mL foi coletado para cada uma das frações resultantes da eluição em hexano 100% (frações 1 a 60) e hexano-AcOEt na proporção de 98:2 (Frações 60 a 1076). Ainda, foram coletadas frações de 500 mL em hexano-AcOEt na proporção de 90:10 (Frações 1077 a 1088) e apenas AcOEt 100% (1089-2000).

As frações foram monitoradas por CCDC para identificação dos diterpenos. O primeiro diterpeno identificado (423 a 502) apresentou característica de um cristal após rotaevaporação sobre pressão reduzida e uma alíquota de 15 mg da fração, foi solubilizada em CDCl_3 para análise por RMN de ^1H e ^{13}C . O resultado mostrou ser o ácido caurenóico (dados não mostrados) e as frações subsequentes foram monitoradas e agrupadas de acordo com o padrão de CCDC.

A partir da fração 591 outro composto com característica de óleo incolor foi identificado. As frações seguintes foram monitoradas e uma alíquota de 15 mg da amostra foram encaminhadas a análise por RMN de ^1H e ^{13}C , de modo que os espectros foram elucidados como o composto ácido copálico. As frações foram monitoradas e reunidas (591-913) de acordo com o perfil de CCDC.

Dessa forma, todas as frações foram avaliadas e agrupadas conforme a tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Frações obtidas após cromatografia em coluna clássica de 8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento e frações resultantes da reunião de frações de acordo com os padrões de CCD. Frações em destaques foram avaliadas por RMN.

Frações resultantes	Frações reunidas
I	1-60
II	61-75
III	76-202
IV	203-253
V	254-330
VI	331-390
VII	391-422
VIII	423-502
IX	503-516
X	517-590
XI	591-913
XII	914-1001
XIII	1002-1076
XV	1077-1087
XVI	1087-1095

Conforme apresentado na tabela 2, um total de 322 frações foi reunido (Fração XI), o que resultou em um produto final de 2,7 g. Posteriormente, uma alíquota do produto foi analisada por CLAE, para avaliação final do perfil cromatográfico da amostra. Porém observou-se a presença de importantes sinais de impureza e uma nova metodologia foi necessária para obter o ácido copálico com maior grau de pureza.

Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi o método selecionado. Sílica gel 60 PF₂₅₄ foi utilizada para o preparo das placas, de modo que para cada 10 placas de vidro (20 x 20 cm, 1 mm de espessura) foram pesadas 100 g de sílica gel. Após pesagem, misturou-se a sílica em etanol até adquirir consistência adequada, para então, ser distribuídas sobre as placas na espessura de 0,5 mm. Após secagem, as placas foram mantidas em estufa por 1 hora a 100 °C.

O sistema eluente foi composto pela mistura de hexano:AcOEt na proporção 90:10 (v/v) e metanol:ácido fórmico 4:1 (v/v). Cada 30 mg da amostra foi solubilizada em AcOEt e aplicada a uma distância de 2 cm da borda inferior de cada placa, as quais foram dispostas em cuba cromatográfica contendo o sistema eluente. O processo foi repetido por três vezes para alcançar a separação efetiva entre os compostos e ao final, as placas foram analisadas através da exposição à lâmpada UV.

Após análise, a região de cada placa contendo o composto foi marcada, o material foi raspado com o auxílio de uma espátula e coletado em papel de filtro. Em seguida, o material foi transferido para um erlenmeyer, onde se adicionou AcOEt. Com auxílio de um kitasato e bomba de vácuo, o material foi extraído com 300 mL de AcOEt e 300 mL de metanol. Ambas as frações foram concentradas separadamente por meio de rotaevaporador sobre pressão reduzida e o produto final foi reunido em apenas um frasco de vidro previamente pesado.

Uma alíquota do produto foi analisada por CCD, CLAE, CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C . O resultado de RMN foi condizente com o ácido copálico e as análises subsequentes, demonstraram que a amostra apresentou perfil favorável a confecção dos testes propostos no presente trabalho. Esse protocolo de isolamento foi reproduzido por cinco vezes com o escopo de obter o composto ácido copálico em quantidade suficiente para realização das sínteses. Durante esse processo foi recuperado aproximadamente, 500 mg do ácido copálico, de modo que uma alíquota de 50 mg foram direcionados para os ensaios biológicos *in vitro* e o remanescente, para síntese dos derivados.

3.4.6 Síntese dos derivados semissintéticos do ácido copálico

No projeto inicial, foi proposta a síntese parcial de seis derivados do ácido copálico, porém, a quantidade do composto de interesse isolado (450 mg) foi suficiente apenas para produzir duas reações, as quais foram realizadas no sentido da preparação do respectivo éster etílico, assim como a preparação de uma amida, para o qual foi empregado benzilamina, como demonstrado na figura abaixo:

Onde se pretende -R:

-NH₂Bn;

-CH₂-CH₃;

3.4.7 Obtenção do derivado amida a partir do ácido copálico

Em um balão de fundo redondo de 5 mL contendo ácido copálico (0,66 mmol, 0,2 g) e benzilamina (1,32 mmol, 0,14 g) solúvel em 1 mL de tetrahydrofurano (THF), foi adicionado gradativamente uma solução de N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) (1,65 mmol, 0,34 g) e 2 mL de THF. Além disso, foram adicionados cristais de dimetilaminopiridina (DMAP) como

agente catalisador e a mistura resultante foi mantida sobre agitação magnética a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a dicicloexiluréia formada foi separada por filtração e o solvente foi removido em rotaevaporador sobre pressão reduzida. As análises de CG indicaram que diferentes produtos foram formados, após a reação química e então, o produto bruto foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica. Utilizou-se sílica gel 60 como fase estacionária e hexano:AcOEt – 8:2 como eluente, porém, as análises de CG e CCDC indicaram que o fracionamento não foi eficiente para obter o produto de interesse.

Esquema 1. Reação do ácido copálico com benzilamina

3.4.8 Reação de esterificação do ácido copálico

Em um balão de fundo redondo de 5 mL contendo ácido copálico (0,72 mmol, 0,22 g) e etanol anidro (2,16 mmol, 0,13 g) solúvel em 1 mL de THF, foram adicionados gradativamente em uma solução de DCC (1,65 mmol, 0,34 g) solúvel em 2 mL de THF. Além disso, foram adicionados cristais de DMAP como agente catalisador e a mistura resultante foi mantida sobre agitação magnética a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a dicicloexiluréia formada foi separada por filtração e o solvente foi removido em rotaevaporador sobre pressão reduzida. As análises de CG indicaram que diferentes produtos foram formados após a reação química e então, o produto bruto foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica. Utilizou-se sílica gel 60 como fase estacionária e hexano:AcOEt – 8:2 como eluente, porém, as análises de CG e CCDC indicaram que o fracionamento não foi eficiente para obter o produto de interesse.

Esquema 2. Reação de obtenção do éster do ácido copálico.

Portanto, a metodologia adota para o fracionamento dos produtos da síntese não foram adequados, de modo que não foi possível confeccionar os ensaios biológicos propostos.

3.5 PARTE 2. Obtenção de derivados semissintéticos do óxido de cariofileno

Paralelamente a execução da parte 1 do presente trabalho, discutiu-se uma nova proposta de obtenção de compostos com potencial atividade contra *T. cruzi* através da produção de derivados semissintéticos do sesquiterpeno óxido de cariofileno. Toda metodologia apresentada nas etapas seguintes do presente trabalho foi realizada em colaboração com o professor Dr. Giuliano Cesar Clososki e o aluno de pós-doutorado Dr. Rafael Augusto Soldi do NPPNS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.5.1 Fluxograma da para obtenção de derivados semissintéticos do óxido de cariofileno

Esquema 3. Resumo esquemático dos compostos obtidos a partir das reações com óxido de cariofileno.

3.5.2 Obtenção do óxido de cariofileno

O composto (–)- óxido de cariofileno é um sesquiterpeno de forma molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}$

(MM= 220,35 g/mol) e foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich) com 98% de pureza.

3.5.3 Reação de hidrogenação catalítica

Preparou-se uma solução do óxido de cariofileno (2,27 mmol, 0,50 g) em 5 mL de AcOEt, contendo uma suspensão de paládio sobre carbono ativado (Pd/C) (10 % / 0,02 g). A solução foi agitada sobre atmosfera de hidrogênio (25 psi) em um sistema Parr por 3 h. Após este período, produto da reação foi filtrado e o solvente foi concentrado em rotaevaporador sobre pressão reduzida. O produto totalmente saturado, denominada derivado 1 (**D1**), foi obtido em 90 % de rendimento (0,45 g).

Esquema 4. Reação de hidrogenação catalítica do óxido de cariofileno

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,84 (d; J 6,8 Hz; 2 H); 0,94 (d; J 6,4 Hz; 9 H); 1,17 – 1,25 (m; 2 H); 1,27 (s; 3 H); 1,28 – 1,43 (m; 3 H); 1,61 – 1,73 (m; 3 H); 2,00 – 2,22 (m; 3 H); 2,90 (dd; J 11,0 Hz; J 3,9 Hz; 1 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 17,3; 19,6; 21,5; 27,3; 27,5; 28,2; 29,9; 33,6; 33,8; 34,8; 38,8; 45,7; 46,7; 60,2; 64,9.

3.5.4 Abertura de anel epóxido com Hidreto de Lítio e Alumínio (LiAlH_4)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, preparou-se uma suspensão de hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4) (60 mmol, 2,30 g) solúvel em 50 mL de THF, adicionou-se lentamente uma solução do óxido de cariofileno (10 mmol, 2,20 g) solúvel em 10 mL de THF anidro. Manteve-se o meio sobre agitação magnética e atmosfera inerte por 1 h na temperatura ambiente. Em seguida o meio foi aquecido a 70 °C e a temperatura mantida por 12 horas.

A solução foi resfriada a 0 °C e cuidadosamente, adicionou-se pequenas porções de uma solução 2 mol/L de hidróxido de sódio (5 mL). A mistura foi agitada por 20 min a 0 °C e por 30 min à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura e a transferiu para um funil de separação, o qual foi lavado com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a vácuo. A reação gerou dois

produtos que foram separados através de coluna impregnada com nitrato de prata (AgNO_3 – 5%) e eluição em hexano – AcOEt – 9:1. O derivado 2 (**D2**) foi obtido rendimento de 50 % (1,10 g) e o derivado 3 (**D3**) em 41 % (0,90 g)

Esquema 5. Reação do óxido de cariofileno com LiAlH_4

RMN de ^1H de D2 (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,89 – 0,94 (m; 9H); 1,52 – 1,53 (m; 1H); 1,54 – 1,56 (m; 1H); 1,57 – 1,59 (m; 1H); 1,59 – 1,62 (m; 3 H); 1,62 – 1,74 (m; 4 H); 1,86 – 1,97 (m; 2H); 1,97 – 2,06 (m; 1H); 2,19 – 2,30 (m; 3H); 4,51 – 4,57 (m; 1H); 4,77 (s; 1H); 4,80 (s; 1H); 5,36 (ddq; J 6,7 Hz; J 6,4 Hz; J 0,5 Hz; 1H).

RMN de ^{13}C de D2 (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 16,9; 22,2; 26,9; 30,2; 32,3; 33,8; 36,5; 37,1; 42,9; 52,8; 69,6; 109,9; 125,6; 136,9; 153,3.

EM de D2 (70 eV; m/z; abundância relativa %): 220 (3); 201 (3); 191 (8); 178 (6); 177 (4); 175 (4); 173 (10); 165 (5); 164 (4); 163 (16); 162 (3); 161 (7); 160 (3); 159 (4); 151 (4); 150 (9); 149 (20); 148 (7); 147 (11); 146 (3); 145 (10); 137 (6); 137 (15); 136 (8); 135 (23); 134 (9); 133 (18); 132 (4); 131 (11); 125 (5); 124 (7); 123 (28); 122 (14); 121 (32); 120 (12); 119 (20); 118 (4); 117 (14); 116 (3); 114 (5); 110 (4); 109 (27); 108 (18); 107 (64); 106 (13); 105 (35); 104 (3); 103 (5); 97 (2); 97 (10); 96 (29); 95 (33); 94 (14); 93 (62); 92 (19); 91 (76); 85 (15); 83 (9); 81 (30); 80 (25); 79 (95); 78 (14); 77 (45); 71 (29); 70 (10); 69 (100); 68 (8); 67 (57); 66 (10); 65 (21); 63 (4); 57 (10); 56 (9); 55 (45); 54 (8); 53 (34); 52 (7); 51 (10).

RMN de ^1H de D3 (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,91 (s; 6H); 1,48 – 1,58 (m; 3H); 1,62 – 1,81 (m; 4H); 1,84 – 2,00 (m; 2H); 2,19 – 2,35 (m; 2H); 2,45 (dt; J 13,0 Hz ; J 3,8 Hz; 1H); 4,02 (dd; J 8,9 Hz; J 3,8 Hz); 4,70 (s; 1H); 4,72 (s; 1H); 4,90 (s; 1H); 4,97 (s; 1H).

RMN de ^{13}C de D3 (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 22,0; 30,0; 30,6; 32,4; 32,6; 32,8; 33,4; 37,0; 43,8; 54,2; 75,2; 109,1; 113,6; 151,2; 152,5.

EM de D3 (70 eV; m/z; abundância relativa %): 220 (3); 191 (4); 188 (3); 187 (3); 177 (3); 177 (7); 175 (5); 173 (8); 172 (3); 162 (3); 161 (8); 160 (6); 159 (8); 157 (3); 153 (4); 151 (4); 149 (6); 149 (26); 148 (4); 147 (12); 146 (4); 144 (14); 143 (4); 137 (6); 136 (7); 135 (21); 134 (14); 133 (20); 132 (7); 131 (21); 129(7); 125 (3); 124 (7); 123 (17); 122 (17); 121 (25); 120 (10); 119 (29); 118 (9); 117 (18); 116 (4); 115 (6); 111 (8); 110 (5); 109 (22); 108 (19); 107 (47); 106 (19); 105 (44); 104 (7); 103 (5); 98 (4); 97 (10); 95 (8); 95 (44); 94 (24); 93 (66); 92 (19); 91 (84); 85 (11); 83 (22); 82 (44); 81 (40); 80 (14); 79 (100); 78 (12); 77 (49); 70 (7); 70 (8); 69 (70); 68 (13); 67 (57); 66 (8); 65 (27); 62 (3); 59 (4); 57 (8); 56 (11); 55 (79); 54 (8); 53 (39); 52 (7); 51 (10).

3.5.5 Obtenção do derivado 4

Como descrito anteriormente, o produto da reação com LiAlH_4 resultou na mistura de **D2** e **D3**. Inicialmente, ambos os derivados não foram separados por métodos cromatográficos comuns, de modo que se propôs a realização de uma reação de acetilação do produto em mistura, como demonstrado a seguir. Em uma solução da mistura de **D2** e **D3** em DCM foram adicionados anidrido acético e piridina, os quais permaneceram sobre agitação magnética à temperatura ambiente por 12 h. O produto foi extraído com solução de sulfato de cobre, posteriormente, com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e por fim, solução saturada de cloreto de sódio. O produto foi seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em rotaevaporador sobre pressão reduzida. Os dados de CG demonstraram que a reação foi efetiva, porém os produtos permaneceram em mistura de dois compostos com $\text{MM} = 262$ g/mol (**D5** e **D6**).

Contudo no intuito de verificar a possível atividade farmacológica, o produto foi testado em mistura, e posteriormente para uma melhor avaliação das potencialidades desses compostos, os produtos **D2** e **D3** foram separados (dados descritos no item anterior) e as reações de acetilação foram repetidas, como descritos nos itens a seguir.

3.5.6 Reação de acetilação de D2 para obtenção do derivado 5

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, preparou-se uma solução de **D2** (2,27 mmol, 0,5 g) em 10 mL de DCM, aos quais foram adicionados anidrido acético (11,35 mmol, 1,25 mL) e piridina (1 mL). A mistura final permaneceu sobre agitação magnética à

temperatura ambiente por 12 h. O produto resultante foi extraído com solução de sulfato de cobre, posteriormente, com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e por fim, solução saturada de cloreto de sódio. O produto foi seco com sulfato de sódio anidro, concentrado em rotaevaporador sobre pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica (*flash*) com eluição em hexano:AcEtO – 8:2. O derivado 5 (**D5**) foi obtido rendimento de rendimento 76 % (0,45 g).

Esquema 6. Reação de acetilação de **D2**

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,93 (d; J 11,2 Hz; 6 H); 1,55 – 1,57 (m; 4 H); 1,66 – 1,74 (m; 2 H); 1,75 – 1,85 (m; 1 H); 1,86 – 1,92 (m; 1H); 1,94 (s; 3 H); 2,09 – 2,19 (m; 1H); 2,24 – 2,34 (m; 2 H); 2,36 – 2,46 (m; 1 H); 4,80 (s; 3 H); 5,42 (ddd; J 7,8 Hz; J 5,8 Hz; J 1,5 Hz; 1 H); 5,50 (d; J 3,3 Hz; 1 H) ; 5,53 (d; J 3,8 Hz; 1 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 17,5; 21,2; 22,3; 26,5; 30,2; 32,0; 33,6; 34,0; 37,2; 42,6; 52,7; 72,8; 110,5; 127,7; 133,3; 152,7; 170,1.

EM (70 eV; m/z; abundância relativa %): 262 (1); 247 (1); 220 (1); 202 (3); 201 (1); 193 (1); 192 (1); 191 (1); 189 (1); 188 (1); 187 (9); 180 (1); 179 (1); 178 (1); 177 (1); 176 (1); 175 (2); 174 (8); 173 (5); 172 (1); 171 (1); 165 (1); 164 (1); 163 (2); 162 (1); 161 (4); 160 (5); 159 (23); 158 (1); 157 (1); 152 (1); 151 (5); 150 (1); 149 (4); 148 (2); 147 (7); 146 (16); 145 (15); 144 (1); 143 (1); 138 (1); 137 (2); 136 (3); 135 (10); 134 (7); 133 (19); 132 (10); 131 (30); 130 (2); 129 (3); 128 (2); 127 (1); 125 (1); 124 (1); 123 (4); 122 (5); 121 (10); 120 (11); 119 (34); 118 (100); 117 (40); 116 (3); 115 (4); 113 (1); 112 (1); 111 (1); 110 (2); 109 (13); 108 (5); 107 (19); 106 (14); 105 (36); 104 (7); 103 (3); 102 (1); 97 (2); 96 (4); 95 (13); 94 (7); 93 (30); 92 (15); 91 (57); 90 (1); 89 (1); 85 (1); 84 (1); 83 (6); 82 (10); 81 (16); 80 (7); 79 (38); 78 (8); 77 (21); 76 (1); 71 (2); 70 (4); 69 (47); 68 (4); 67 (26); 66 (4); 65 (10); 64 (1); 63 (1); 61 (1); 59 (1); 58 (1); 57 (3); 56 (4); 55 (23); 54 (3); 53 (15); 52 (2); 51 (3); 50 (1).

3.5.7 Reação de acetilação de **D3** para obtenção do derivado **6**

Em um balão de fundo redondo de 25mL, preparou-se uma solução do derivado 3 (1,81 mmol, 0,4 g) em 10 mL de diclorometano, aos quais foram adicionados anidrido acético (11,35 mmol, 1,25 mL) e piridina (1 mL). A mistura final permaneceu sobre agitação magnética à temperatura ambiente por 12 h. O produto resultante da reação foi extraído com solução de sulfato de cobre, em seguida uma solução saturada de bicarbonato de sódio e por fim, solução saturada de cloreto de sódio. O produto foi seco com sulfato de sódio anidro, concentrado em rotaevaporador sobre pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica (*flash*) com eluição em hexano:AcEtO – 8:2. O derivado 6 (**D6**) foi obtido rendimento de 82 % (0,40 g).

Esquema 7. Reação de acetilação de **D3**

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,92 (s; 6 H); 1,41 – 1,59 (m; 2 H); 1,63 – 1,78 (m; 2 H); 1,82 – 1,92 (m; 1H); 1,96 (s; 3 H); 2,20 – 2,35 (m; 3 H); 2,36 – 2,47 (m; 1H); 4,74 (s; 3 H); 4,91 (s; 1 H); 4,97 (s; 1 H); 5,07 (dd; J 9,3 Hz; J 4,3 Hz; 2 H); 5,22 (s; 1 H)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 21,3; 21,9; 29,9; 30,4; 30,6; 32,6; 33,6; 33,9; 36,8; 43,9; 54,6; 76,8; 109,3; 115,4; 147,2; 151,8; 170,2.

EM (70 eV; m/z; abundância relativa %): 262 (1); 247 (1); 220 (3); 219 (1); 205 (2); 204 (1); 203 (3); 202 (13); 201 (1); 193 (1); 192 (1); 191 (1); 189 (1); 188 (7); 187 (45); 186 (1); 180 (1); 179 (1); 178 (1); 177 (3); 176 (2); 175 (3); 174 (10); 173 (14); 172 (1); 171 (1); 165 (1); 164 (4); 163 (4); 162 (4); 161 (23); 160 (14); 159 (52); 158 (2); 157 (1); 152 (2); 151 (8); 150 (3); 149 (13); 148 (10); 147 (31); 146 (42); 145 (45); 144 (3); 143 (3); 142 (1); 139 (1); 138 (2); 137 (5); 136 (10); 135 (26); 134 (16); 133 (50); 132 (21); 131 (100); 130 (6); 129 (7); 128 (4); 127 (1); 126 (1); 125 (1); 124 (6); 123 (19); 122 (11); 121 (32); 120 (26); 119 (45); 118 (25); 117 (33); 116 (5); 115 (8); 114 (1); 113 (1); 112 (1); 111 (3); 110 (7); 109 (42); 108 (20); 107 (54); 106 (23); 105 (92); 104 (9); 103 (7); 102 (1); 99 (1); 98 (1); 97 (8); 96 (10); 95 (31); 94 (15); 93 (80); 92 (27); 91 (91); 90 (1); 89 (1); 85 (3); 84 (7); 83 (10); 82 (17); 81 (42); 80 (15); 79 (58); 78 (12); 77 (41); 76 (1); 74 (1); 72 (1); 72 (3); 71 (8); 70 (3); 69 (33);

68 (6); 67 (42); 66 (6); 65 (18); 64 (1); 63 (2); 61 (1); 60 (1); 59 (4); 58 (1); 57 (10); 56 (8); 55 (58); 54 (7); 53 (30); 52 (4); 51 (6); 50 (1).

3.5.8 Reação de D2 com Iodo

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, preparou-se uma solução de imidazol (5,9 mmol, 0,40 g) e trifenilfosfina (PPh_3) (2,32 mmol, 0,61 g) em 10 mL de DCM previamente resfriado a 0 °C. Em seguida, foram adicionados lentamente iodo (2,40 mmol, 0,61 g). A mistura permaneceu sob agitação por 10 min e, então foi acrescentado lentamente, uma solução do **D2** (1,95 mmol, 0,43 g) em 6 mL de DCM. A mistura reacional permaneceu sobre agitação por 4 h a temperatura ambiente, na ausência de luz. Removeu-se o solvente em rotaevaporador sobre pressão reduzida e o produto foi purificado através de coluna cromatográfica (*flash*) com eluição em hexano. O derivado 7 (**D7**) foi obtido rendimento de 82 % (0,40 g).

Esquema 8. Reação de **D2** com Iodo

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,91 – 1,20 (m; 6 H); 1,48 – 1,64 (m; 2 H); 1,65 – 1,77 (m; 1 H); 1,80 -1,85 (m; 3 H); 1,90 -2,06 (m; 4 H); 2,07 – 2,28 (m; 4 H); 2,30 – 2,60 (m; 2 H); 2,70 – 2,83 (m; 1 H); 4,45 – 4,59 (m; 1 H); 4,72 (s; 1H); 4,79 (s; 1H); 5,25 – 5,45 (m; 1 H)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 19,7; 20,4; 22,7; 29,1; 29,95; 32,7; 33,4; 34,8; 39,4; 40,0; 43,35; 49,8; 51,6; 110,7; 125,6; 136,3; 153,5.

3.5.9 Reação de D3 com Iodo

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, preparou-se uma solução de imidazol (5,16 mmol, 0,45 g) e PPh_3 (2,06 mmol, 0,54 g) em 10 mL de DCM, previamente resfriado a 0 °C. Em seguida, adicionou-se lentamente iodo (1,90 mmol, 0,48 g). A mistura permaneceu sobre agitação por 10 min, e então se acrescentou lentamente uma solução de **D3** (1,72 mmol, 0,38

g) em 6 mL de DCM. A mistura reacional permaneceu sobre agitação por 4 h a temperatura ambiente, na ausência de luz. Removeu-se o solvente em rotaevaporador sobre pressão reduzida e o produto foi purificado através de coluna cromatográfica (*flash*) com eluição em hexano. O produto foi instável à presença de luz.

Esquema 9. Reação de **D3** com Iodo

3.6 Compostos avaliados

Os compostos avaliados no presente trabalho incluem: Óleo de copaíba, ácido 19-ent-cauranóico, ácido copálico, óxido de cariofileno e os derivados **D1**, **D2**, **D3**, **D4**, **D5**, **D6**, **D7**. As substâncias foram diluídas em DMSO nas concentrações de 1,0 - 3,0 - 9,0 - 27,0 - 81,0 - 243,0 e 729,0 μ M, de modo que a concentração de DMSO em cultura não foi superior a 1,5 %.

3.7 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A ação citotóxica das substâncias foi avaliada pelo método do sal tetrazol MTT, um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta uma coloração amarelada. O composto é facilmente incorporado às células viáveis e reduzido pelas desidrogenases mitocondriais. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto *formazan* de coloração azul-escuro, insolúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio mede a quantidade de *formazan* formado através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância é diretamente proporcional ao número de células viáveis no meio.

Células LLC-MK2 em um estágio de crescimento semi-confluyente foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. O precipitado de células foi ressuspensionado em meio RPMI (sem vermelho de fenol) e a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL. Um volume de 400 μ L foi adicionado nas diferentes concentrações das substâncias referidas e então, aplicados em triplicata sobre placa de 96 poços. A placa foi incubada por 24 horas em estufa com atmosfera úmida a 37 °C e com 5 % de CO_2 .

Após este período, adicionou-se 10 µL de solução MTT (5 mg/mL) e incubou-se a placa a 37 °C por 4 horas ao abrigo da luz. Posteriormente, aplicou-se 90 µL da solução SDS 10 %/HCl 0,01 N e incubou-se a placa por mais 1 hora. Por fim, a placa foi lida em espectrofotômetro (Biotek) a 570 nm.

Como controle positivo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle negativo, células com 1,5% de DMSO. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \{1 - [(Y - N)/(N - P)]\} * 100$$

Onde: Y= leitura da densidade óptica dos poços com células e diferentes concentrações das substâncias; N= leitura da densidade óptica dos poços com células com 1,5 % de DMSO; P= leitura da densidade óptica dos poços com meio de cultura.

3.8 Testes de viabilidade nas formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Culturas de parasitos da cepa Y e Bolívia em fase exponencial de crescimento foram diluídas para 1×10^7 parasitos/mL. Um volume de 400 uL de cada cepa foram adicionados nas diferentes concentrações das substâncias referidas e então, aplicadas em triplicata sobre placa de 96 poços. Empregaram-se dois tipos de controle para cada experimento: controle positivo apenas com meio de cultura e como controle negativo parasitos com 1,5% de DMSO, todos aplicados em triplicata. Incubou-se a placa em câmara úmida a 28°C por 72h. Após este período, o teste de viabilidade das formas epimastigotas foi realizado por MTT e os dados obtidos foram processados como descrito anteriormente.

Como controle positivo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle negativo parasitos com 1,5% de DMSO. A porcentagem de viabilidade foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \{1 - [(Y - N)/(N - P)]\} * 100$$

Onde: Y= leitura da densidade óptica dos poços com parasitos nas diferentes concentrações das substâncias; N= leitura da densidade óptica dos poços com parasitos com 1,5 % de DMSO; P= leitura da densidade óptica dos poços com meio de cultura.

3.9 Testes de viabilidade nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Uma linhagem celular de fibroblasto humano foram subcultivadas semanalmente em frascos para cultura celular de 72 cm². Após apresentarem um perfil semi-confluente, a linhagem foi infectada com 1 mL da cultura de epimastigotas de cada cepa, em fase estacionária de crescimento e envelhecida por 14 dias (CAMARGO, 1964). A infecção foi realizada com 1 mL da cultura de epimastigotas e após 24 horas, as culturas infectadas foram lavadas com PBS 1X (Phosphate Buffered Saline). As células foram observadas diariamente até a liberação das formas tripomastigotas, que ocorreu entre o quinto e sétimo dia pós-infecção. O meio de cultura foi coletado em tubos de 50 mL e a primeira centrifugação foi realizada a 1000 rpm por 5 min para precipitação de células mortas. O volume foi transferido para um novo recipiente que sofreu processo de centrifugação a 5000 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em RPMI-1640 (sem vermelho de fenol).

A cultura com tripomastigotas foi ajustada para 1×10^6 células/mL e um alíquota de 400 uL da cepa Y e Bolívia foram adicionados nas diferentes concentrações das substâncias referidas e então, aplicadas em triplicata sobre placa de 96 poços. Como controle positivo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle negativo parasitos com 1,5 % de DMSO. Incubou-se a placa em atmosfera úmida a 37 °C e com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após este período, o teste de viabilidade das formas tripomastigotas foi realizado pelo sal de tetrazol XTT, um composto de coloração amarelo facilmente incorporado por células viáveis e reduzido pelas desidrogenases mitocondriais. Ao ser reduzido, o XTT é convertido em um composto *formazan* de coloração laranja. O ensaio mede a quantidade de *formazan* formado através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância é diretamente proporcional ao número de parasitos viáveis no meio. Adicionou-se 50µL de uma solução de XTT com PMS (Phenazine methosulfate) na proporção de 1 mg/mL XTT para 0.001 mg/mL de PMS e incubou-se a placa em atmosfera úmida a 37°C e com 5% de CO₂ por 4 horas ao abrigo da luz. Ao término, a placa foi lida em espectrofotômetro (Biotek) a 450 nm (POLANCO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Os dados foram processados como descrito no item anterior.

3.10 Análise estatística

Todos os ensaios foram aplicados em triplicata e reproduzidos em ocasiões diferentes, de modo que as leituras de absorbância foram processadas pelo método estatístico de curva

dose-resposta sigmoidal do programa *GraphPad Prism 5.0*. A média e o desvio padrão entre os resultados obtidos para cada experimento foi comparada com os resultados para o composto padrão benzonidazol através da análise estatística one way ANNOVA com teste complementar de Dunnett's (*Dunnett's multiple comparison test*). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise do oleorresina de copaíba e obtenção da fração de diterpenos

A primeira análise do perfil cromatográfico do oleorresina por CG-EM revelou a presença de duas regiões de eluição específicas, de acordo com dados da literatura (VEIGA, JUNIOR et al., 1995; VEIGA, JUNIOR et al., 1997). A massa molecular das substâncias foi confirmada através dos respectivos íons moleculares apresentados pelo espectro de massas, de modo que, a primeira região, de menor tempo de retenção, corresponde à região de sesquiterpenos e a segunda, corresponde à região de diterpenos. A fração de sesquiterpenos exibiu grande sobreposição de picos e apresentou-se majoritária na amostra.

Figura 7. Perfil cromatográfico do oleorresina de copaíba da espécie *Copaifera langsdorffii*. Presença de duas regiões de eluição característica de sesquiterpenos e diterpenos.

O oleorresina de copaíba é extensivamente utilizado na medicina popular principalmente na Região Norte do Brasil, onde o produto é comercializado tanto em feiras livres como em lojas de produtos naturais para uso oral ou tópico (VASCONCELOS, GODINHO, 2002). Os conhecimentos sobre as propriedades medicinais do oleorresina agregaram valor industrial a esse produto, que também é utilizado em vernizes e lacas e exportado para a indústria de cosméticos e perfumes (VEIGA- JUNIOR, PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004).

Esse panorama proporcionou um aumento significativo na demanda do produto, porém, como a produção do oleorresina é conhecidamente variável entre diferentes espécies de *Copaifera* e entre a mesma espécie, o volume de oleorresina extraído tornou-se insuficiente

para atender às necessidades comerciais e industriais, de modo que as amostras são frequentemente adulteradas (VEIGA-JUNIOR et al., 1997). É importante citar que a adulteração ocorre principalmente, pela adição de óleo mineral ou óleo de diferentes fontes vegetais (VEIGA-JUNIOR et al., 1997; VASCONCELOS, GODINHO, 2002; BARBOSA et al., 2009)

A sazonalidade e as alterações ambientais são fatores determinantes na quantidade e composição química do oleorresina de copaíba (VEIGA-JUNIOR et al., 1997; VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002). Contudo, é possível afirmar que esse é basicamente constituído por sesquiterpenos e diterpenos, onde os sesquiterpenos são mais abundantes e responsáveis pelo aroma típico do óleo (LANGENHEIM, 2003, GOBBO-NETO, LOPES, 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2005). A aplicação de técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas possibilitou um profundo conhecimento dos principais constituintes presentes no oleorresina e permitiu a padronização de análises para validar a autenticidade desse produto (VEIGA-JUNIOR et al., 1997). Portanto, as análises de CG e EM obtidas nesse trabalho permitem inferir que o oleorresina de copaíba não sofreu adulteração por adição de óleo de outras fontes.

Portanto, submeteu-se uma alíquota do oleorresina de copaíba ao fracionamento por cromatografia em coluna clássica com o intuito de obter uma fração majoritária em diterpenos. Por meio das análises de CCDC e CG-EM (figura 8) selecionou-se a amostra FR1 para subfracionamento e obtenção do ácido copálico.

Figura 8. Perfil cromatográfico de CG-EM da amostra FR1

Apesar do perfil cromatográfico de FR1 (figura 8) exibir sinais de sesquiterpenos, esses se encontram em menor concentração quando comparados ao produto bruto.

4.2 Obtenção do ácido copálico

O grande interesse de estudo do oleorresina concentra-se especialmente na análise farmacológica dos principais constituintes encontrados nessas amostras (PATITUCCI et al., 1995; VEIGA-JUNIOR et al., 2005; IZUMI et al., 2012). O fracionamento do oleorresina de copaíba por métodos cromatográficos em conjunto com técnicas de CG-EM e RNM, proporcionou um grande conhecimento de inúmeras moléculas biologicamente ativas (PATITUCCI et al., 1995; BROCHINI et al., 1999; RATES, 2001; BAKKALI et al., 2008; GELMINI et al., 2013). O ácido copálico representa uma substância comum e majoritária na maioria das análises de identificação de diferentes espécies de *Copaifera* (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002, BARBOSA, 2012, IZUMI, 2012, SANTOS, 2008). Portanto, um dos objetivos deste trabalho consistiu em obter o ácido copálico por métodos cromatográficos em quantidade suficiente para produzir derivados semissintéticos e determinar a potencial atividade contra *T. cruzi*.

Diferentes metodologias foram realizadas para obter o ácido copálico. A cromatografia por coluna clássica SCM foi proposta para subfracionamento de FR1, de acordo com Souza (2012). No entanto, após análise dos perfis de CCD e CG-EM das frações reunidas, observou-se que a metodologia não foi adequada para isolar o composto de interesse. Apesar da eluição da coluna em 100% de hexano e aumento crescente da polaridade pela combinação hexano-AcOEt, ainda foi possível identificar sinais de sesquiterpenos e mistura de diterpenos.

Uma segunda metodologia foi adotada através da extração ácido-base do oleorresina de copaíba, subsequente a uma reação de esterificação da fração ácida de interesse, de acordo com protocolo modificado de Nunes (1994). Dados da literatura corroboram que a extração ácido-base do oleorresina em combinação com a esterificação da fração ácida e cromatografia clássica demonstraram ser metodologias eficazes na obtenção do ácido copálico (NUNES, 1994, ROMERO, 2007, BARRETO-JÚNIOR, 2005).

O processo de esterificação resulta em uma mudança na polaridade de alguns compostos e conseqüentemente, no perfil de separação cromatográfica da amostra (NUNES, 1994). No entanto, apesar de ser observada uma modificação do perfil cromatográfico em relação ao produto não esterificado pela análise de CCDC, os resultados obtidos pelo fracionamento em coluna clássica SCM não foram apropriados. Então, apesar do aumento gradativo da polaridade do eluente, as dimensões da coluna utilizada em conjunto com a quantidade de sílica e de amostra empregadas, não foram seletivas para separar os diterpenos e obter o composto desejado.

É importante ressaltar que durante esse processo cromatográfico, obteve-se um material com característica de cristal, sugestivo de uma amostra com alto grau de pureza, como pode ser observado nos resultados de CLAE (Figura A) e CG-EM (Figura B). O produto cristalizado apresentou porcentagem relativa de área de 95,42% e uma alíquota da amostra foi submetida à análise por RMN de ^1H e ^{13}C .

Figura 9. Perfil cromatográfico: A) Ácido 19-ent-cauranóico por CLAE. B) Ácido 19-ent-cauranóico por CG-EM

O espectro de RMN de ^1H da amostra (Apêndice A) apresenta diferentes sinais entre δ 0,8 a 2,2, o que indica pouca oxigenação e insaturação. Dentre estes sinais destacam-se dois singletos em δ 0,97 e δ 1,26 e um duplete em δ 1,05, todos se integrando para 3H cada. Na análise do espectro de ^{13}C (Apêndice B) verifica-se a presença de 20 sinais, com destaque àquele em δ 184,6 com possibilidade de atribuição para carbono carboxílico. Em estudo comparativo com a literatura (BATISTA et al., 2007), esses dados foram bastante similares àqueles obtidos para o diterpeno ácido caurenóico. No entanto, no espectro de ^1H para o ácido caurenóico podem ser observados sinais que se referem aos hidrogênios olefínicos e no respectivo espectro de ^{13}C verificam-se sinais de carbonos insaturados do tipo sp^2 . Por isso, ao se considerar o duplete em δ 1,05 e a falta de carbonos insaturados, concluiu-se que o componente purificado em questão, refere-se ao ácido 19-ent-cauranóico, o qual não

apresenta hidrogênios olefínicos, mas sim hidrogênios metílicos entre os carbonos 16 e 17 (Figura 10).

Ácido 19-*ent*-cauranóico

MM= 304 g /mol

RMN de ^1H (Apêndice A)

RMN de ^{13}C (Apêndice B)

Figura 10. Ácido 19-*ent*-cauranóico

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,97 (s; 3 H); 1,05 (d; 3 H); 1,26 (s; 3 H); 1,91 (d; 1 H); 2,18 (d; 1H)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 15, 49; 15, 78; 18,95; 19,05; 22,08; 25,89; 28,93; 34,37; 37,79; 39,62; 40,70; 40,75; 42,15; 43,70; 44,77; 48,68; 56,52; 57,05; 104,59

EM (70 eV; m/z; abundância relativa): 304(33); 275(23); 259(20); 189(27); 149(20); 136(18); 123(35); 109(45); 93(50);(16); 81(68); 67(60); 55(78); 41(100).

A princípio, a escolha da metodologia por fracionamento em coluna cromatográfica clássica foi eleita, por ser o método mais utilizado, rápido e com possibilidades de obtenção de produtos naturais em escala de gramas (COLLINS et al., 2006). A quantidade das substâncias ou extratos semipurificados são etapas essenciais para o estudo farmacológico em protocolos *in vitro* e *in vivo*, além de possibilitar a proposta de inúmeras reações para produzir derivados semissintéticos e potencializar as atividades dessas estruturas químicas (BARRETO-JUNIOR, 2005). No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que as técnicas empregadas não foram adequadas para obter o composto de interesse, embora proporcionaram a obtenção do composto ácido 19-*ent*-cauranóico, pouco descrito na literatura (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

Devido às dificuldades encontradas para atingir o objetivo proposto, sugeriu-se o fracionamento da FR1 por uma coluna clássica de dimensões maiores (8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento) e maior proporção de sílica. Portanto, foi utilizado 1g de amostra para 100 g de sílica gel, com intuito de se obter maior eficiência da coluna. O

resultado do perfil cromatográfico de FR1 por CLAE mostrou que os diterpenos apresentam tempos de retenção muito próximos, o que dificultou a obtenção do composto em sua forma pura. Desse modo, a polaridade do eluente mantida em hexano-AcOEt 98:2 (Frações 60 a 1076), em conjunto com a proporção de sílica utilizada, tamanho e diâmetro da coluna favoreceram o fracionamento dessa região complexa de diterpenos, como demonstrado abaixo em uma análise por CLAE (figura 11.B). Uma alíquota da amostra foi encaminhada para análise por RMN de ^1H e ^{13}C , de modo que os espectros foram elucidados como o composto ácido copálico.

Figura 11. A) Perfil cromatográfico da fração de diterpenos (FR1) obtida após fracionamento do oleorresina de copaíba. B) Perfil cromatográfico do ácido copálico após fracionamento em coluna cromatográfica com 8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento.

No entanto, é importante ressaltar que apesar dos resultados adequados obtidos por esta metodologia, um segundo procedimento foi necessário para se obter o composto com maior grau de pureza através da CCDP. Como demonstrado nas análises por CLAE e CG-EM (figura 12), a região contaminante da amostra foi eliminada e o ácido copálico foi obtido com porcentagem de área relativa de (84,90%). Alguns trabalhos demonstraram a utilização de CCDP como um método eficaz para se obter terpenos isolados (SILVA et al., 2009; ARAUJO et al., 2009; SOUZA et al., 2011; COSTA et al., 2012).

Figura 12. Perfil cromatográfico: A) ácido copálico por CLAE. B) ácido copálico por CG-EM

A fim de se confirmar a estrutura do ácido copálico obtido pelas metodologias descritas, uma alíquota da amostra foi encaminhada para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H (Apêndice C) é possível verificar a presença de três singletos integrados para 1H cada com deslocamentos químicos em δ 5,67, 4,85 e 4,49, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios H-14, H-17a e H-17b, respectivamente. Esses sinais são característicos de diterpenos do tipo labdano, comumente encontrados em plantas do gênero *Copaifera* (VEIGA-JUNIOR et al., 2007). Neste espectro, também podem ser observados singletos em δ 0,68, 0,80, 0,87 e 2,17 integrados para 3H cada, que podem ser atribuídos aos hidrogênios das metilas H-20, H-19, H-18 e H-16, respectivamente. O deslocamento paramagnético observado para os hidrogênios da metila H-16 em relação às demais, deve-se ao fato desta metila estar ligada a um carbono do tipo sp^2 .

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice D) observa-se a presença de 20 sinais, destacando-se a presença de um sinal de carbono carboxílico (δ 172,3; C-15), e sinais de carbonos olefínicos em δ 106,2, 114,7, 148,1 e 164,0, referentes aos C-17, C-14, C-8 e C-13, respectivamente. Esse conjunto de dados, juntamente com o estudo comparativo com a literatura, nos permite propor que o diterpeno em questão é denominado ácido *ent*-copálico (VEIGA-JUNIOR et al., 2007).

Ácido *ent*-copálico

MM=304 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice C)RMN de ^{13}C (Apêndice D)**Figura 13.** Estrutura química do ácido copálico

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,68 (s; 3 H); 0,79 (s; 3 H); 0,87 (s; 3 H); 2,0 (m; 2 H); 1,96 (s; 3 H); 2,17 (s; 3 H); 2,3 (t; 1H); 2,35 (d; 1 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 14,34; 19,12; 19,24; 21,35; 21,59; 24,30; 33,46; 38,15; 38,91; 39,57; 39,96; 41,96; 55,34; 55,98; 106,25; 114,78; 148,13; 164,01; 172,25; 172,32.

EM (70 eV; m/z; abundância relativa): 304(1,6); 289(24); 271(1,6); 261(1,6); 244(2); 234(2); 219(2); 205(68); 189 (4); 177(16); 149(20); 137(52); 123(40); 109(50); 95(84); 81(96); 69(64); 55(62); 41(78)

Conforme demonstrado pelos resultados CG-EM e HPLC, a grande dificuldade na obtenção do ácido copálico esteve relacionada principalmente à complexidade das amostras obtidas mesmo após o fracionamento cromatográfico, em especial a proximidade dos tempos de retenção entre diterpenos. É importante relatar que a característica polar, as semelhanças estruturais e a presença de isômeros na fração de diterpenos determinam a proximidade dos tempos de retenção e complexidade em amostras do oleorresina de copaíba (GELMINI et al., 2013)

Na separação cromatográfica, a migração diferencial dos componentes de uma mistura é dependente da interação entre a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS, 2006). A sílica gel é um polímero tridimensional de unidades tetraédricas de óxido de silício ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e a natureza química da superfície da sílica é constituída por grupos silanóis expostos, que podem formar fortes ligações, principalmente com grupos polares (ácidos carboxílicos). Consequentemente, a separação se estabelece em função da polaridade dos compostos em

mistura e da fase móvel (eluente) (GIDDINGS, 2002; MOLDOVEANU, 2004; COLLINS, 2006).

Além disso, a eficiência da coluna na separação dos compostos também está relacionada às dimensões da coluna (diâmetro e comprimento), de forma que quanto maior o comprimento da coluna maior será a quantidade formada de pratos teóricos (MOLDOVEANU, 2004; COLLINS, 2006). O modelo teórico de pratos pressupõe que a coluna cromatográfica é contida de um grande número de camadas separadas, de modo que a separação equilibrada da amostra entre a fase estacionária e móvel ocorrer nestas "placas" (COLLINS, 2006). A substância se move pela coluna através de transferência de fase móvel equilibrada de uma placa para a outra, de forma a proporcionar a maior eficiência na separação de compostos com polaridades semelhantes.

A obtenção do ácido copálico por CCDP foi eficaz na obtenção de um produto mais purificado e mostrou-se como uma técnica reproduzível, apesar de ser um procedimento onde há perda de material pela ligação de parte do componente a sílica de forma irreversível. Desse modo, a quantidade do composto isolado (450 mg) foi suficiente apenas para produzir duas reações de síntese, as quais foram realizadas no sentido da preparação do respectivo éster etílico, assim como a preparação de uma amida, para o qual foi empregado benzilamina. Porém, os dados de CG-EM (dados não mostrados) revelaram que as reações produziram diferentes produtos, que não puderam ser separados por coluna cromatográfica para elucidação das estruturas geradas.

A fim de determinar as potencialidades dos diterpenos, foi um dos objetivos do presente trabalho avaliar a atividade farmacológica do diterpeno ácido copálico, em especial o ácido cauranóico, que representa uma estrutura pouco descrita na literatura (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

4.3 Síntese parcial de derivados do óxido de cariofileno

4.3.1 Reação de hidrogenação catalítica

A primeira modificação química do óxido de cariofileno foi obtida pela redução da ligação dupla na posição C8, após reação de hidrogenação catalítica, na qual foi empregada Pd/C como catalisador. O produto foi obtido em 90 % de rendimento.

D1: 4,9,12,12-tetrametil-5-oxatriciclo[8.2.0.0]dodecano
MM=222,20 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice E)

RMN de ^{13}C (Apêndice F)

Figura 14. Estrutura química de **D1**

Figura 15. Perfil cromatográfico: (A) Produto da reação de hidrogenação catalítica, **D1**; (B) Perfil cromatográfico do óxido de cariofileno.

4.3.2 Redução com Hidreto de Lítio e Alumínio (LiAlH_4)

No intuito de obter diferentes estruturas a partir do óxido de cariofileno, uma segunda metodologia foi proposta através da reação de abertura do anel epóxido pela reação com LiAlH_4 (BOMBARDA et al., 1995; KAS'YAN et al., 2008; VIDAL et al., 2010; SANTANGELO et al., 2001). Como demonstrado pela análise de CG, foram identificados à formação de dois produtos, com tempos de retenção diferentes ao produto de partida, conforme o perfil cromatográfico apresentados na figura 16. Apesar do LiAlH_4 ser muito reativo, altos rendimentos só foram obtidos após 24 horas de reação sob refluxo.

Figura 16. Perfil cromatográfico: (A) Produtos da reação com LiAlH_4 , **D2** e **D3**. (B) óxido de cariofileno

O grande desafio dessa etapa do trabalho consistiu na separação desses produtos, pois quando submetidos à CCDC, foi observado que independentemente da polaridade da fase móvel empregada, os compostos apresentaram a mesma polaridade, ou polaridades muito semelhantes, de modo que a separação por coluna cromatográfica clássica com sílica comum não foi adequada para separar ambos os produtos.

Então, submeteu-se o produto da reação a coluna cromatográfica clássica com sílica impregnada com nitrato de prata (AgNO_3) como descrito por Andreão et al. (2010). Todo o processo de separação foi acompanhado por CG e a eficiência do processo pode ser visualizada na figura 17, no qual o composto que foi coletado nas primeiras frações, apresenta menor tempo de retenção (A), enquanto o composto de maior tempo de retenção foi coletado posteriormente (B).

Figura 17. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, **D2**. (B) Segundo conjunto de frações, **D3**; (C) mistura de **D2** e **D3**.

Ambos os derivados foram analisados por técnicas unidimensionais e bidimensionais de RMN para determinar a correta estrutura dos compostos. Na figura 18 está apresentado o espectro de correlação heteronuclear de quantum-simples de **D2** (HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence), no qual o espectro correlaciona os sinais de um espectro de RMN de ^1H com os sinais de um espectro de RMN de ^{13}C . Com isto é possível observar os hidrogênios que estão ligados especificamente a cada carbono.

Deste modo podemos observar que o multipeto centrado em δ 4,54 ppm apresenta correlação direto com o sinal em δ 69,3 ppm, característico de carbono carbinólico (C5), assim como o sinal em δ 4,79 ppm está correlacionado ao carbono δ 109,9 ppm, associado a ligação dupla do óxido de cariofileno de partida (C13). Destaca-se ainda, o sinal em δ 5,36 ppm, que apresenta correlação com o sinal do carbono em δ 125,4 ppm, atribuído a presença de uma nova insaturação introduzida da reação com LiAlH_4 .

Figura 18. Espectro de HSQC para **D2**

Por outro lado, o experimento de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) (Figura 19) mostrou como principais correlações do sinal carbono carbinólico em

δ 4,54 ppm com δ 16,9 ppm (C12), assim como correlação com δ 125,6 ppm (C3) e não possui correlação com C13 (δ 109,9 ppm). Dessa forma, estrutura pode ser confirmada através dessas correlações, conforme mostrado anteriormente para **D2**.

Figura 19. Espectro de HMQC para **D2**.

D2: 4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol
MM=222,20 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice G)

RMN de ^{13}C (Apêndice H)

Espectro de HSQC (I)

Espectro de HMQC (J)

Figura 20. Estrutura química de **D2**

O mesmo estudo foi realizado para **D3** e a figura 21 demonstra o resultado de HSQC, no qual se destaca o sinal centrado em δ 4,02 ppm que apresenta correlação com o sinal em δ 75,3 ppm e demonstra ser este o sinal referente ao carbono carbinólico (C5). Da mesma forma podemos observar que o sinal em δ 4,71 ppm apresenta correlação com o sinal em δ 109,1

ppm (C13), referente a ligação dupla do material de partida. Observa-se ainda a o sinal em δ 4,97 ppm que apresenta correlação com δ 113,6 ppm (C12).

A figura 22 apresenta o experimento de HMQC para o **D3**, no qual podemos observar que o sinal em δ 4,02 ppm exibe correlação com o sinal em δ 113,6 ppm (C12), assim como uma correlação fraca com o sinal δ 151,2 ppm (C4). Essas correlações demonstram que a nova ligação dupla esta na posição C4 fora do anel. Assim a estrutura pode ser confirmada através dessas correlações, conforme mostrado abaixo:

Figura 21. Espectro de HSQC para o **D3**.

Figura 22. Espectro de HMQC para **D3**.

D3: 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo[7.2.0]undecen-5-ol
MM=222,20 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice K)

RMN de ^{13}C (Apêndice L)

Espectro de HSQC (M)

Espectro de HMQC (N)

Figura 23. Estrutura química de **D3**

4.3.3 Acetilação de D2 e D3

Uma vez estabelecida as corretas estruturas obtidas através da reação do óxido de cariofileno com LiAlH_4 , optou-se por explorar a reatividade dessa hidroxila (-OH) introduzida na estrutura. Para isso, realizou-se a esterificação da mesma com anidrido acético e piridina e os produtos foram obtidos em bons rendimentos. As estruturas dos materiais de partida foram preservadas, de modo que ocorreu apenas a substituição da hidroxila pelo grupo funcional acetila (-COCH₃), como esperado.

D5: Acetato de 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ila

MM= 262,19 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice O)

RMN de ^{13}C (Apêndice P)

Figura 24. Estrutura química de **D5**

Figura 25. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, **D5**; (B) Óxido de cariofileno.

D6: Acetato de 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo [7.2.0]undecan-5-ila

MM=262,19 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice Q)

RMN de ^{13}C (Apêndice R)

Figura 26. Estrutura química de **D6**

Figura 27. Perfil cromatográfico: (A) Segundo conjunto de frações, **D6**; (B) Óxido de cariofileno.

4.3.4 Reação de D2 e D3 com Iodo (I)

Da mesma maneira, optou-se por realizar a substituição da hidroxila por um iodo (**D7** e **D8**), empregando trifenilfosfina e imidazol (LI, 2007). Entretanto, o **D8** não foi instável em presença de luz, de modo que em menos de 24 horas o composto degradou e não foi possível a caracterização.

D7: 5-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-eno
MM=262,19 g/mol

RMN de ^1H (Apêndice S)

RMN de ^{13}C (Apêndice T)

Figura 28. Estrutura química de **D7**

Figura 29. Perfil cromatográfico: (A) Primeiro conjunto de frações, **D7**; (B) Óxido de cariofileno.

4.4 Testes biológicos *in vitro*

4.4.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade das substâncias estudadas

A porcentagem de viabilidade celular foi elaborada através dos resultados de absorbância obtidos, em função do logaritmo das concentrações das substâncias avaliadas. A concentração citotóxica máxima das células (CC50 do inglês, Cytotoxicity Concentration of 50 %) foi definida pela concentração de um composto em que se observa 50% do seu efeito máximo, após um determinado tempo de exposição. Dessa forma, quanto maior o valor de

CC50 menor o efeito citotóxico das substâncias sobre as células estudadas (SEBAUGH, 2011). Os dados apresentados na tabela 3 representam a média de CC50 e desvio padrão entre dois experimentos realizados em diferentes ocasiões. As médias de CC50 foram comparadas com os resultados para o composto padrão benzonidazol através da análise estatística one way ANOVA com teste complementar de Dunnett (figura 30). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado após leitura efetuada em 24 horas. Para a linhagem celular LLCMK2, a média dos valores de viabilidade apresentadas para as substâncias variaram entre CC50 104,45 μM e 342,05 μM , conforme apresentado na tabela 3. O benzonidazol apresentou CC50 igual a 2.546,5 μM .

Tabela 3. Média dos resultados de citotoxicidade *in vitro* das substâncias e benzonidazol sobre a linhagem LLC-MK2 após 24 horas.

Compostos	LLCMK2 Média CC ₅₀ (μM) ± Desvio Padrão
Óleo de Copaíba	104,45 ± 0,35
Ácido Cauranóico	185,25 ± 0,05
Ácido Copálico	195,05 ± 22,5
Óxido Cariofileno	223,7 ± 6,15
D1	309,75 ± 33,75
D2	337,9 ± 2,9
D3	342,05 ± 0,25
D4	219,15 ± 7,15
D5	106,35 ± 0,05
D6	130,6 ± 9,6
D7	234,1 ± 32,9
Benzonidazol	2.546,5 ± 220,5

Figura 30. Média dos resultados de citotoxicidade *in vitro* das substâncias e benzonidazol sobre a linhagem LLC-MK2 após 24 horas. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias com o composto padrão benzonidazol. (***) $p < 0.001$). BZL (benzonidazol); OC (óleo de copaíba); AC (ácido copálico); ACau (ácido cauranóico); OxC, (óxido de cariofileno).

Como pode ser observado na figura 30, as diferenças do benzonidazol para todas as substâncias avaliadas foram estatisticamente significativas, de modo que as substâncias apresentaram maior efeito tóxico sobre células LLC-MK2 quando comparados ao composto padrão. Porém, é importante observar que a redução da dupla ligação do óxido de cariofileno na posição C8 (**D1**) e a abertura do anel epóxido pela reação com LiAlH_4 (**D2** e **D3**) demonstraram ser reações químicas importantes na diminuição do efeito tóxico sobre as células de mamíferos em comparação ao composto de origem. Deve ser destacado que a substituição do anel epóxido pelo grupo funcional hidroxila (OH) causou o melhor resultado para redução da citotoxicidade, de modo que **D2** e **D3** apresentaram respectivamente IC₅₀ de 337,9 e 342,05 μM em comparação ao óxido de cariofileno que apresentou IC₅₀ 223,7 μM . É relatado na literatura que o grupo epóxido presente da estrutura do óxido de cariofileno, devido à sua instabilidade, é considerado como intermediários eletrófilos reativos, que podem formar adutos covalentes com macromoléculas celulares, como proteínas e DNA (YANG et al., 1993). Porém, Di solto et al. (2013) demonstraram que óxido de cariofileno não possui potencial genotóxico e mutagênico

A reação de substituição de - OH pelo grupo funcional - COCH_3 em **D2** e **D3** que gerou os produtos **D5** e **D6**, aumentou a ação citotóxica dos compostos, que apresentam IC₅₀

106,35 e 130,6 μM , respectivamente. Porém, a ação combinada de **D5** e **D6** representada pelo composto **D4** (CC50 219,15), reduziu a citotoxicidade das substâncias. A substituição de -OH por Iodo (**D7**) aumentou a citotoxicidade do composto, porém o resultado obtido (IC50 234,1 μM) foi semelhante ao valor de IC50 para o óxido de cariofileno (IC50 223,7 μM). Para os diterpenos, ácido cauranóico e ácido copálico, os resultados demonstram considerável toxicidade desses compostos *in vitro* após 24 h de exposição, com valores de IC50 195,05 e 185,25 μM , respectivamente.

Pesquisas sobre a avaliação segura do uso de produtos naturais no Brasil são incipientes (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Além disso, somente 37% dos artigos publicados na última década relataram resultados para a citotoxicidade dos compostos estudados, apesar desse dado representar o principal impedimento para o desenvolvimento de novos medicamentos (RATES, 2001; IZUMI et al., 2013). No caso da doença de Chagas, a busca de terapias alternativas para tratamento dos doentes está especialmente relacionada aos metabólitos resultantes da ação dos compostos benzonidazol e nifurtimox, que causam severos efeitos tóxicos aos tecidos do hospedeiro e conseqüentemente, inúmeros efeitos colaterais (URBINA, DOCAMPO, 2003; CASTRO et al., 2006). Aliás, essa realidade representa o principal motivo da suspensão do fornecimento do nifurtimox para a maioria dos países, inclusive o Brasil (MARIN-NETO et al., 2009)

Apesar de o oleorresina ser amplamente utilizado na medicina popular por milhares de anos, alguns dados da literatura demonstram que diversas espécies de *Copaifera* apresentam considerável efeito tóxico sobre células de mamíferos *in vitro* (SANTOS et al., 2008; IZUMI et al., 2012). A corroborar com a literatura, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram considerável efeito tóxico do oleorresina sobre células LLC-MK2 (IC50 104,45 μM).

No entanto, alguns trabalhos relatam diferentes resultados para toxicidade *in vivo*. A dose letal média oral (DL50 oral) determinada em camundongos e ratos foram maiores do que 2000 mg/kg de peso corporal, o que sugere uma baixa toxicidade oral aguda do oleorresina (GOMES et al., 2007; SACHETTI et al., 2009). A DL50 oral é definida como a quantidade de uma substância necessária para matar 50 % de uma população de animais submetidos a uma única administração via oral dentro de um curto período de tempo. É importante citar ainda, que Maistro et al. (2005) não encontraram nenhuma evidência de genotoxicidade para oleorresina de *Copaifera duckei* submetido ao ensaio de micronúcleo de medula óssea de ratos.

Estudos toxicológicos do oleorresina de copaíba e dos constituintes identificados são relativamente escassos. Sabe-se que substâncias químicas quando administradas no organismo

são biotransformadas por uma enorme variedade de enzimas, que podem torná-las benéficas, tóxicas ou ainda, inativas (CHIN, FERREIRA, 1999). Os testes *in vitro* demonstram diferenças importantes de citotoxicidade do oleorresina em relação aos protocolos *in vivo*, o que se deve provavelmente pela biotransformação desse produto por mecanismos ainda não bem compreendidos, porém que provavelmente, torna o oleorresina passível de utilização para as inúmeras patologias descritas na literatura (CHIN, FERREIRA, 1999; RATES, 2001; DOS REIS TUROLLA, DE SOUZA NASCIMENTO, 2006)

4.4.2 Testes de viabilidade nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A porcentagem de viabilidade das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foi elaborada através dos resultados de absorbância obtidos em função do logaritmo das concentrações das substâncias avaliadas. A concentração inibitória máxima dos parasitos (IC50 do inglês, inhibitory concentration of 50 %) foi definida pela concentração de um composto em que se observa 50% do seu efeito máximo, após um determinado tempo de exposição. Dessa forma, quanto menor o valor de IC50 maior o efeito tóxico das substâncias sobre as formas do *T. cruzi* (SEBAUGH, 2011).

Os valores de IC50 das substâncias de estudo e o benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* para cepa Y estão apresentados na tabela 4. O índice de seletividade (IS) também são apresentados para ambas as cepas. É importante reforçar que o valor do IS consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC50) para células LLC-MK2 e IC50 para as formas tripomastigotas, de modo que quanto maior for o valor de seletividade mais específica é a toxicidade do composto sobre o parasito.

As médias de IC50 para as formas epimastigotas (figura 31) e tripomastigotas (figura 32) das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* foram estatisticamente comparadas com os resultados para o benzonidazol, como descrito anteriormente.

Tabela 4. Média da concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. O valor de IS entre as células LLC-MK2 e as formas tripomastigotas da cepa Y são apresentados.

Compostos	CEPA Y		IS CC50 LLC-MK2/ IC50 Tripomastigota
	<u>Epimastigotas</u> Média IC ₅₀ (µM) ± Desvio Padrão	<u>Tripomastigotas</u> Média IC ₅₀ (µM) ± Desvio Padrão	
Óleo de Copaíba	60,68 ± 8,06	45,65 ± 3,36	2,28
Ácido Cauranóico	117,05 ± 14,95	161,7 ± 18,80	1,14
Ácido Copálico	67,52 ± 33,2	149,05 ± 9,25	1,30
Óxido de cariofileno	210,5 ± 4,98	224,6 ± 19,80	0,99
D1	70,68 ± 8,36	160,65 ± 30,35	1,92
D2	112,34 ± 20,75	127,7 ± 6,30	2,64
D3	56,55 ± 1,63	99,61 ± 2,88	3,43
D4	50,48 ± 3,12	85,71 ± 3,19	2,55
D5	33,52 ± 9,77	55,65 ± 13,48	1,91
D6	28,57 ± 11,71	42,19 ± 3,62	3,09
D7	45,87 ± 12,56	81,37 ± 13,45	2,87
Benzonidazol	11,26 ± 0,05	223,25 ± 3,45	11,40

A ação das substâncias **D4**, **D5**, **D6** e **D7** sobre as formas epimastigotas foi estatisticamente iguais ao benzonidazol. Porém, deve-se destacar que as substâncias, **D5** e **D6** foram as mais ativas, com valores de IC₅₀ 33,52 e 28,57 µM, respectivamente. É importante citar que, exceto pelo óxido de cariofileno, todas as substâncias foram estatisticamente mais ativas para as formas tripomastigotas do que o composto padrão.

Os valores de IC₅₀ das substâncias de estudo e o benzonidazol sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* para cepa Bolívia estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Média da concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. O valor de SI entre as células LLC-MK2 e as formas tripomastigotas da cepa Bolívia são apresentados.

Compostos	CEPA BOLÍVIA		IS CC50 LLC-MK2/ IC50 Tripomastigota
	<u>Epimastigotas</u> Média IC ₅₀ (µM) ± Desvio Padrão	<u>Tripomastigotas</u> Média IC ₅₀ (µM) ± Desvio Padrão	
Óleo de Copaíba	68,87 ± 1,22	31,1 ± 5,77	3,35
Ácido Cauranóico	108,55 ± 1,05	147,20 ± 31,7	1,25
Ácido Copálico	66,22 ± 1,11	72,53 ± 15,80	2,26
Óxido de cariofileno	211,30 ± 14,90	98,74 ± 25,25	2,68
D1	79,31 ± 7,54	38,61 ± 11,8	8,02
D2	86,74 ± 16,75	51,30 ± 14,27	6,58
D3	54,98 ± 14,10	42,91 ± 11,83	7,97
D4	31,66 ± 7,81	34,44 ± 5,17	6,36
D5	26,72 ± 11,97	46,10 ± 0,74	2,30
D6	25,20 ± 7,56	35,94 ± 5,68	3,63
D7	43,27 ± 11,47	65,12 ± 1,24	3,59
Benzonidazol	9,86 ± 2,06	92,22 ± 14,68	27,61

A corroborar com os resultados para a cepa Y, a ação das substâncias **D4**, **D5** e **D6** (exceto **D7**) sobre as formas epimastigotas foi estatisticamente igual ao benzonidazol. As substâncias, **D5** e **D6** foram as mais ativas, com valores de IC₅₀ 26,72 e 25,20, respectivamente. A ação do óxido de cariofileno sobre as formas tripomastigotas não foi significativo em relação ao composto padrão, porém para o óleo de copaíba, **D1**, **D3**, **D4** e **D6** os resultados foram promissores.

Figura 31. Média dos resultados de concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas epimastigotas da cepa Y e Bolívia de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias e o composto padrão benzonidazol (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo). BZL (benzonidazol), OC (óleo de copaíba), AC (ácido copálico), ACau (ácido cauranóico), OxC (óxido de cariofileno).

Figura 32. Média dos resultados de concentração eficaz das substâncias e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas da cepa Y e Bolívia de *T. cruzi* após 72 horas *in vitro*. One-way ANOVA – Teste de Dunnett's: comparação dos resultados das substâncias e o composto padrão benzonidazol (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo). BZL (benzonidazol), OC (óleo de copaíba), AC (ácido copálico), ACau (ácido cauranóico), OxC (óxido de cariofileno).

Izumi et al. (2012) determinaram a atividade citotóxica de sete diterpenos sobre células LLC-MK2 e sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*. Todos apresentaram atividade citotóxica moderada, no entanto, os resultados obtidos para as formas amastigotas mostraram-se promissores, especialmente para o ácido copálico, que apresentou melhor atividade tanto para as formas tripomastigotas quanto amastigotas de *T. cruzi*. Além disso, a atividade do ácido copálico sobre as formas epimastigotas provocou intumescimento da mitocôndria em todas as concentrações estudadas.

A corroborar com os dados publicados, os diterpenos, ácido copálico e o ácido cauranóico, apresentaram efeito tóxico moderado sobre células LLC-MK2 após 24 horas de exposição aos compostos. A atividade do ácido cauranóico sobre epimastigotas e tripomastigotas de ambas as cepas, demonstrou que os valores de IC₅₀ foram semelhantes aos obtidos para as células de mamífero e, portanto, o composto apresentou baixo índice de seletividade (IS 1,14 cepa Y e 1,25 cepa Bolívia). É importante citar, que em relação ao benzonidazol, ambos os compostos apresentaram atividade significativa sobre as formas tripomastigotas da cepa Y. Contudo, para a cepa Bolívia essa relação não foi significativa.

Os compostos naturais representam uma fonte inesgotável de material de partida estruturalmente importantes para a produção de novos compostos, que apresentem melhor atividade farmacológica e menor toxicidade para o hospedeiro (CORDELL, 2000; BALUNAS, KINGHOR, 2005; CLARDY, WALSH, 2004; KOEHN, CARTER, 2005; GURIB-FAKIM, 2006). Haraguchi et al. (2011) demonstraram que diversos derivados semissintéticos do diterpeno ácido caureonóico apresentaram menor atividade citotóxica e maior atividade tripanocida do que o composto bruto. Esse trabalho sugeriu que a produção de derivados semissintéticos de compostos naturais pode ser uma importante técnica na obtenção de estruturas ativas contra parasitos, mas que causem menores danos às células de mamíferos. Domínguez-Carmona et al. (2010) relataram ainda, que reações de esterificação e oxidação do triterpeno ácido betulínico potencializaram a atividade farmacológica da substância contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os produtos naturais e os derivados naturais ou sintéticos representam a maioria dos medicamentos em uso clínico no mundo (NEWMAN et al., 2003; GURIB-FAKIM, 2006). Assim, paralelamente ao objetivo inicial deste trabalho foi discutida uma nova proposta de obtenção de compostos com potencial atividade sobre o *Trypanosoma cruzi* através da síntese de derivados semissintéticos do sesquiterpeno óxido de cariofileno. O óxido de cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico que pode ser encontrado em óleos essenciais de diversas espécies de plantas medicinais e comestíveis (DI SOLTO et al., 2013).

Polanco-Hernández et al. (2012) demonstraram um forte efeito sinérgico do triterpeno lupenona e o óxido de cariofileno (1:4) contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ = 10.4 µg/mL). O efeito ainda foi observado em ensaios *in vivo*, onde houve uma redução de mais de 80% do número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco e no músculo esquelético de ratos infectados.

Izumi et al. (2012) relatou que o sesquiterpeno β-cariofileno, um sesquiterpeno estruturalmente semelhante ao óxido de cariofileno, apresentou baixo efeito tóxico sobre células de mamíferos, porém também provocou menor atividade contra as formas evolutivas do *T. cruzi* quando comparados aos diterpenos avaliados. Porém, foi demonstrado que a sensibilidade das formas epimastigotas ao β-cariofileno foi provocada pela total desorganização do cinetoplasto e formação de vacúolos membranosos concêntricos em todas as partes do parasito.

Nos resultados obtidos foi possível observar que o óxido de cariofileno apresentou menor toxicidade para células LLC-MK2 em relação aos diterpenos ácido cauranóico, ácido copálico e o oleorresina de copaíba. O mesmo foi observado para as formas evolutivas de *T. cruzi*, as quais demonstram menor sensibilidade ao efeito do óxido de cariofileno do que os diterpenos, embora as formas tripomastigotas da cepa Bolívia (IC₅₀ 98,74 µM) demonstraram considerável sensibilidade à ação do composto.

A cepa Bolívia também foi mais sensível à ação sinérgica das substâncias **D5** e **D6**, de modo que a mistura (**D4**) foi seis vezes mais tóxica para os parasitos do que para a célula LLC-MK2. Além disso, a sinergia aumentou duas e três vezes a seletividade de **D5** e **D6**, sobre os parasitos, respectivamente. Tem sido demonstrado na literatura, que os terpenos apresentam importante atividade farmacológica quando testados em sinergia (POLANCO-HERNÁNDEZ et al., 2013P, IZUMI et al., 2012). Izumi et al. (2012) demonstraram que o β-cariofileno apresentou importante atividade contra formas replicativas de *T. cruzi*, porém em combinação com o ácido copálico a atividade contra os tripomastigotas aumentou 40 vezes. Pelizzaro-Rocha et al. (2010) relataram que o partenolídio, um sesquiterpeno-lactona isolado a partir de *T. parthenium*, apresentou forte efeito sinérgico com o benzonidazol contra epimastigotas de *T. cruzi*.

É importante relatar, que **D3** e **D6** representam os melhores resultados de atividade para a cepa Y, pois ambos foram três vezes mais tóxicos para as formas tripomastigotas do que para as células LLC-MK2. **D6** foi obtido a partir de **D3** através da substituição de – OH pelo grupo – COCH₃, de modo que ambos possuem uma dupla ligação em C4. A presença da dupla ligação associada ao grupo funcional acetila proporcionou menor citotoxicidade e maior

atividade de **D6** sobre as formas epimastigotas (IC₅₀ 28,57 μ M) e tripomastigotas (IC₅₀ 42,19 μ M) da cepa Y de *T. cruzi*. Porém, para a cepa Bolívia, os compostos **D1**, **D2** e **D3** representam os resultados mais importantes, pois foram seis a oito vezes mais tóxicos para o parasito do que para as células LLC-MK2.

É importante relatar que grande parte dos fármacos em uso clínico no mundo são heterocíclicos, ou seja, são compostos cíclicos que possuem um ou mais átomos diferentes do carbono nas estruturas em anel. O nitrogênio é o principal átomo presente nessas moléculas, seguidos do enxofre e oxigênio, porém, pode ser encontrados compostos com mais de um heteroátomo, no mesmo sistema heterocíclico (BARREIRO, 1991; BARREIRO, RODRIGUES, 2001; MENEGATTI et al., 2001).

Lactonas sesquiterpênicas, obtidos a partir de membros das famílias Asteraceae e Lauraceae, demonstraram maior atividade para as formas replicativas do protozoário *T. cruzi*. Porém, o composto que apresentou grupo funcional hidroxila apresentou melhor atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas (IC₅₀ = 5,72 μ g.ml⁻¹ e 5,30 μ g.ml⁻¹, respectivamente) (IZUMI et al., 2011). Portanto, a corroborar com os dados da literatura, a presença do grupamento -OH reduziu a citotoxicidade e aumentou a atividade sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*, com destaque para a estrutura química de **D3** que apresentou o melhor resultado deste trabalho, tanto por reduzir a citotoxicidade quanto por ser ativo para ambas as formas evolutivas das cepas Y e Bolívia. O composto foi consideravelmente mais tóxico para tripomastigotas de ambas as cepas do que para as células de mamífero (IS= 3,43, cepa Y e IS= 7,97 cepa Bolívia). Além disso, quando comparadas ao benzonidazol, os resultados para a ação de **D3** foram considerados significativos sobre as formas tripomastigotas da cepa Y e Bolívia.

É importante observar que na correlação dos resultados para as formas tripomastigotas da cepa Y e Bolívia, observam-se diferenças importantes da resposta do parasito frente aos compostos estudados e também para o benzonidazol. Os resultados demonstraram, por exemplo, que **D2** e **D3** são mais ativos para a tripomastigotas da cepa Bolívia (IC₅₀ 51,30 e 42,91 μ M, respectivamente) do que para cepa Y (IC₅₀ 127,7 e 99,61 μ M, respectivamente). As diferenças de sensibilidade entre as cepas podem ser explicadas, pelo fato das populações de *T. cruzi* exibirem uma grande variabilidade intraespecífica, como pode ser observada por diferenças na sua morfologia, virulência, patogenicidade, composição antigênica e propriedades bioquímicas (FERNANDES, ANDREWS, 2012; ALVES et al., 2012; BONNEY, 2014). Esse fato também é observado nas terapias disponíveis para a doença de Chagas, pois a grande variabilidade genética das populações do *T. cruzi*, tem sido descrita por

interferir consideravelmente na eficácia terapêutica para a doença de Chagas e contribuem às baixas porcentagens de cura detectadas em pacientes tratados (DE TORANZO, 1988; URBINA, DOCAMPO, 2003).

De maneira geral, os dados obtidos neste trabalho confirmam a efetividade da química orgânica sintética como um mecanismo ímpar para potencializar as estruturas de substâncias terapeuticamente úteis, de modo que todos os derivados semissintéticos do óxido de cariofileno apresentam maior atividade sobre as formas evolutivas do protozoário *T. cruzi* quando comparados ao produto de origem. Além disso, a maioria das substâncias também apresentou maior ação sobre os parasitos do que para células de mamífero.

No entanto, é importante observar que Izumi et al. (2011) relataram que as formas amastigotas são mais sensíveis aos terpenos que outros estágios de vida do parasito. Desse modo, os resultados obtidos para as formas intracelulares amastigotas, bem como a elaboração de ensaios *in vivo* são importantes fatores para avaliar as potencialidades relacionadas a esses compostos. Além disso, fixar parâmetros como a porcentagem eficaz de uma substância e o tempo de tratamento em protocolos *in vivo* deve ser utilizado mais frequentemente, a fim de possibilitar fazer melhores comparações sobre a atividade de um dado composto e o possível efeito tóxico indesejado para o hospedeiro.

5. CONCLUSÕES

- Diferentes metodologias foram necessárias para obter o ácido copálico. A metodologia de extração ácido-base do oleorresina de copaíba, subsequente a uma reação de esterificação da fração ácida de interesse e cromatografia clássica SCM não proporcionou a obtenção do composto de interesse, mas resultou na obtenção do diterpeno ácido 19-ent-cauranóico;
- O subfracionamento de FR1 em uma coluna cromatográfica clássica (8 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento), seguido do fracionamento por CCDP demonstram ser metodologias eficazes para obtenção do ácido copálico. Porém, os produtos semissintéticos do ácido copálico não puderam ser separados por coluna cromatográfica clássica para elucidação das estruturas geradas;
- Os dados obtidos neste trabalho confirmam a efetividade da química orgânica sintética como um mecanismo ímpar para potencializar a atividade das estruturas de substâncias terapeuticamente úteis, de modo que todos os derivados semissintéticos do óxido de cariofileno apresentaram maior atividade sobre as formas evolutivas do protozoário *T. cruzi* quando comparados ao produto bruto;
- Todas as substâncias apresentaram maior efeito citotóxico sobre células LLC-MK2 quando comparados ao composto padrão. Porém, as reações químicas que originaram **D1**, **D2** e **D3** exibiram importantes resultados para reduzir o efeito tóxico sobre as células em comparação ao composto de origem.
- Exceto pelo óxido cariofileno, todas as substâncias foram estatisticamente mais ativas para as formas tripomastigotas da cepa Y do que o benzonidazol. A ação do óxido de cariofileno sobre as formas tripomastigotas da cepa Bolívia não foi significativo em relação ao composto padrão, porém para o óleo de copaíba, **D1**, **D3**, **D4** e **D6** os resultados foram promissores.
- A cepa Bolívia demonstrou maior sensibilidade à ação sinérgica das substâncias **D5** e **D6** do que a cepa Y. De modo que, os resultados demonstram que a mistura foi seis

vezes mais tóxico para tripomastigotas da cepa Bolívia do para a célula LLC-MK2. Além disso, a sinergia aumentou duas e três vezes a seletividade de **D5** e **D6**, sobre essas formas, respectivamente.

- A estrutura química de **D3** mostrou-se promissora, pois os resultados indicaram que o derivado foi efetivo tanto por reduzir a citotoxicidade quanto por ser ativo para ambas as formas das cepas Y e Bolívia do parasito.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-O N, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, Monteiro FA. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108: 92-99.

Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ, Aguilar HM, Miles MA. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010; 4(3): e620.

Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM. *In vitro* activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy research*. 2010; 24(9): 1322-1328.

Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 114: 325–354.

Alves RT, Regasini LO, Funari CS, Young MCM, Rimoldi A, Bolzani VS, Silva DHS, Albuquerque S, Da Rosa JA. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolívia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2012; 22(3): 528-533.

Alves TMDA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EDFA, Smânia Júnior A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; 95(3): 367-373.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi* – host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3(10): 819-823.

Andreão PS, Giacomini RA, Stumbo AM, Waldman WR, Braz-Filho R, Ligiéro CB, Miranda PC. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. *Quim. Nova*. 2010; 33(1): 212-215.

Araujo FCVD, Marques FG, Silva CCD, Santin SMDO, Nakamura CV, Zamuner MLM, Souza MCD. Terpenes isolated of *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Química Nova*. 2009; 32(7): 1760-1763.

Araya JE, Neira I, Silva SD, Mortara RA, Manque P, Cordero E, et al. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(3): 413-418.

Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. *Imperial Novo Milênio*, Rio de Janeiro. 2008; 1:64 pp.

Bakkali H, Marie C, Ly A, Thobie-Gautier C, Graton J, Pipelier M, et al. Functionalized 2, 5-Dipyridinylpyrroles by Electrochemical Reduction of 3, 6-Dipyridinylpyridazine Precursors. *European Journal of Organic Chemistry*. 2008; (12): 2156-2166.

- Balunas MJ, Kinghorn, AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*. 2005; 78(5): 431-441.
- Barbosa KS, Yoshida M, Scudeller VV. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. *Rev Bras Farmacogn*. 2009; 19: 57-60.
- Bardon S, Foussard V, Fournel S, Loubat A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon câncer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett*. 2002; 181: 187–194.
- Barreiro EJ, Bolzani VDS. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*. 2009; 32(3): 679-688.
- Barreiro EJ, Rodrigues C. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 2001; 3: 4-9.
- Barreiro EJ. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. *Química Nova*. 1991; 14(3): 179-188.
- Barreto-Junior CB. Abordagem para a Síntese de Amidas Naturais Bioativas e Seus Análogos. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2005; 199p.
- Batista R, Humberto JL, Chiari E, de Oliveira AB. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007; 15(1): 381-391.
- Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. Novas vacinas para doenças parasitárias negligenciadas e dengue. *Translational Research*. 2013; 162(3): 144-155.
- Bockarie, MJ, Kelly-Hope, LA, Rebollo, M, Molyneux, DH. Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013; 368(1623): 20120144.
- Bombarda I, Gaydou E, Smadja JS, Faure R. Synthesis of Oxygenated Compounds Derived from Caryophyllene. *Chemical Information*. 1995; 132 (8): 836-842
- Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014; 21.
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*. 2001; 161(5): 839-851.
- Brochini CB, Núñez CV, Moreira IC, Roque NF, Chaves MH, Martins D. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Quim Nova*. 1999; 22: 37-40.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med São Paulo*. 1964; 6: 93-100.

Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research*. 2005; 19(11): 946-950.

Cascon V, Carvalho JCT. Copaíba: *Copaifera* spp. Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, São Paulo, Tecmed. 2004; 221-256.

Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. 2000; 55(7): 773-778

Castro JA, Montalto de Mecca, M, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology*. 2006; 25(8): 471-479.

Castro-e-Silva O, Zucoloto S, Ramalho FS, Ramalho LN, Reis J, Bastos AA, Brito MV. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. *Phytotherapy Research*. 2004; 18(1): 92-94.

Chagas C. Nova tripanossomíasse humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909; 1(2): 159-218.

Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* 2010; 17: 149–151.

Chin CM, Ferreira EI. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Química Nova*. 1999; 22, 75-84.

Clardy J, Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 2004; 432(7019): 829-837.

Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*. 2010; 465(n7301_suppl): S12-S15.

Coelho-Ferreira M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol*. 2009; 126, 159–175.

Collins, CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP. 2006; 452p.

Cordell GA. Biodiversity and drug Discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 2000; 55(6): 463-480.

Costa VCDO, Tavares JF, Queiroga CS, Castello-Branco MV, Melo MF, Diniz CUG, Sette I. MF. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* RE FRIES. *Química Nova*. 2012; 35(1): 138-142.

Costa-Lotufo LV, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C, et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*. 2002; 40(8): 1231-1234.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45(3): 286-296.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (1): 3140.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465: S6–S7.

Cunha WR, Martins C, Ferreira DD, Crotti AE, Lopes, NP, Albuquerque S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta medica*. 2003; 69(5): 470-471.

De Mello JF. Plants in traditional medicine in Brazil. *Journal of ethnopharmacology*. 1980; 2(1): 49-55.

De Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JÁ, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *Journal of Infectious Diseases*. 2010; 201(9): 1308-1315.

De Toranzo ED, Castro JA, de Cazzulo BF, Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 1988; 44(10): 880-881.

Deus RJA, Carvalho ASC, Banna DADS, Arruda MSP, Alves CN, Santos AS. *In vitro* fungitoxic effect of the oil-resin and the essential oil of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2009; 11(3): 347-353.

Di Solto A, Maffei F, Hrelia P, Castelli F, Sarpietro MG, Mazzanti G. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2013; 66 (2013): 264–268

Dias JCP, Coura JR, Yasuda MAS. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47: 123-5.

Dias LC, Dessoy MA, Guido RV, Oliva G, Andricopulo, AD. Doenças Tropicais Negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. *Quim. Nova*. 2005; 36(10): 1552-1556.

Docampo R, Stoppani AO. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1979; 197(1): 317-321.

Docampo, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design*. 2001; 7(12): 1157-1164.

- Domínguez-Carmona DB, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Ruiz-Pinell G, Gutierrez-Yapu D, Chan-Bacab MJ, et al. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*. 2010; 17(5): 379-382.
- Dos Reis Turolla MS, de Souza Nascimento E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 42(2).
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B., Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela, JG, Hotez PJ. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. 2013; 11: 1043-1055.
- Ebrahim GJ. Eradication of american trypanosomiasis (Chagas disease): an achievable goal?[editorial]. *Journal of tropical pediatrics*. 2004; 50(6): 320-321.
- Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2003; 424(6951): 957-961.
- Estani SS. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. United States. 1998; 59: 526-9.
- Fernandes MC, Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS microbiology reviews*. 2012; 36(3): 734-747.
- Ferreira MGP, Kayano AM, Silva-Jardim I, Silva TOD, Zuliani JP, Facundo VA, et al. Antileishmanial activity of 3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(6): 1003-1006.
- Garcia RF, Yamaguchi MH. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. *Saúde e Pesquisa*. 2012; 5(1): 137-46.
- Gelmini F, Beretta G, Anselmi C, Centini M, Magni P, Ruscica M, Cavalchini A. 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*. 2013; 440(2): 170-8.
- Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology* 2007; 3(7): 408-414.
- Giddings JC. Dynamics of chromatography: principles and theory. CRC Press. 2002.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 2007; 30(2): 374.
- Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 109(3): 486-492.

- Gomes NDM, Rezende CDM, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of ethnopharmacology*. 2008; 119(1): 179-184.
- Gomes YM, Lorena V, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 115-121.
- Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kılıç T, Çarıkçı S, Mozioglu E, Setzer WN. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem. Lett*. 2011; 4: 448-453.
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*. 2006; 27(1): 1-93.
- Haller JS. The First Miracle Drugs: How the Sulfa Drugs Transformed Medicine. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 2008; 63(1): 119-121.
- Haraguchi SK, Silva AA, Vidotti GJ, Dos Santos PV, Garcia FP, Pedroso RB, et al. Antitrypanosomal Activity of Novel Benzaldehyde-Thiosemicarbazone Derivatives from Kaurenoic Acid. *Molecules*. 2011; 16(2): 1166-1180.
- Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS microbiology letters*. 2004; 237(2): 325-331.
- Izumi E. Efeitos do óleo de copaíba e constituintes em *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. 2010; 93p.
- Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Júnior VFV, Nakamura CV. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural product reports*. 2011; 28(4): 809-823.
- Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura, CV. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. *Journal of medicinal chemistry*. 2012; 55(7): 2994-3001.
- Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga-Júnior VF, Nakamura CV. Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: a comparative study. *Planta Med*. 2013; 79(11): 952-958.
- Karioti A, Skaltsa H, Kaiser M, Tasdemir D. Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*. *Phytomedicine*. 2009; 16(8): 783-787.
- Kas'yan LI, Kas'yan AO, Golodaeva EA. Methods and mechanisms of epoxy compounds reduction. *Russian journal of organic chemistry*. 2008; 44(2): 153-183
- Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*. 2003; 90(2): S55-S62.

- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4(3): 206-220.
- Lange BM, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes—current status and future opportunities. *Plant biotechnology journal*. 2013; 11(2): 169-196.
- Langenheim JH. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany*. Portland, OR: Timber Press. 2003; 586 pp.
- Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108: 34-47.
- Leandro LM, de Sousa Vargas F, Barbosa PCS, Neves JKO, da Silva JA, da Veiga-Junior VF. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*. 2012; 17(4): 3866-3889.
- Lima SR, Junior VFV, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*. 2003, 17(9): 1048-1053.
- Lunardi, I. Síntese do sesterterpeno hyrtiosal a partir do ácido copálico. Determinação da configuração absoluta do produto natural. Campinas. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP. 2002; 265p
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*. 2002; 25(3): 429-438.
- Mackey TK., Liang BA. Threats from emerging and re-emerging neglected tropical diseases (NTDs). *Infection ecology & epidemiology*. 2012; 2.
- Maistro EL, Carvalho JCT, Cascon V, Kaplan MAC. In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. *Genetics and Molecular Biology*. 2005; 28(4): 833-838.
- Manarin R, Lamas MC, Bottasso E, Serra E, Revelli S, Salomón CJ. Efficacy of novel benzimidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology international*. 2013; 62(1): 79-81.
- Manderson L, Aagaard-Hansen J, Allotey P, Gyapong M, Sommerfeld J. Social research on neglected diseases of poverty: continuing and emerging themes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009; 3(2): e332.
- Manoel-Caetano FDS, Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007; 23(10): 2263-2274.
- Marin-Neto JA, Rassi A, Carlos Maciel B, Vinicius Simões M, Schmidt A. Chagas' heart disease. *Evidence-Based Cardiology*, Third Edition. 2010; 823-841.

- Marin-Neto JA, Rassi AJr, Morillo CA et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J*. 2008; 156: 37-43.
- Marin-Neto JA, Rassi JrA, Avezum JrA, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 319-324.
- Martins-da-Silva RC, Pereira JF, de Lima HC. O gênero *Copaifera* (Leguminosae—Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. *Rodriguésia*. 2008; 455-476.
- Maya, JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2007; 146(4): 601-620.
- Mendonça DE, Onofre SB. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19(2B): 577-581.
- Mendoza DT, Ureña González LD, Ortega-Barría E, Capson TL, Rios LC. Five New Cassane Diterpenes from *Myrospermum frutescens* with Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of natural products*. 2003; 66(7): 928-932.
- Menegatti R, Fraga CAM, Barreiro EJ. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 2001; 3: 16-22.
- Moldoveanu SC. Solutions and challenges in sample preparation for chromatography. *Journal of chromatographic science*. 2004; 42(1): 1-14.
- Molyneux D. Neglected tropical diseases. *Community Eye Health*. 2013; 26(82): 21–24.
- Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5): 577-591.
- Morello, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1988; 90(1): 1-12
- Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C, da Silva S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem*. 2008; 47: 101–109.
- MSF. Médico sem fronteiras. Barulho para uma doença silenciosa. 2014; pp 1 Available from: <http://www.msf.org.br/noticias/1453/barulho-para-uma-doenca-silenciosa/>
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products*. 2003; 66(7): 1022-1037.

- Nunes FMN. Síntese de ent-Ambrox e de derivados odoríferos de ambergris e estudo sobre a síntese do ent-Eperuol. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1994; 148pp.
- Nwaka S, Ramirez B, Brun R, Maes L, Douglas F, Ridley R. Advancing drug innovation for neglected diseases—criteria for lead progression. PLoS neglected tropical diseases. 2009; 3(8): e440.
- Oliveira DF, Pereira AC, Figueiredo HC, Carvalho DA, Silva G, Nunes AS, et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. Fitoterapia. 2007; 78(2): 142-145.
- Otoguro K, Iwatsuki M, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara-Tukashima A, Kiyohara H, et al. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma Brucei*. Phytochemistry. 2011; 72(16): 2024-2030.
- Paduch R, Kandefer-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2007; 55(5): 315-327.
- Paiva LAF, Rao VSN, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. Journal of ethnopharmacology. 1998; 62(1): 73-78.
- Paiva LAF, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. Phytotherapy Research. 2002; 16(8): 737-739.
- Patitucci ML, Pinto AC, Cardoso JN. Analysis of crude extracts and fractions of brazilian polypodiaceae by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. I. triterpenes. Phytochemical Analysis. 1995; 6(1): 38-44.
- Paulino M, Iribarne F, Dubin M, Aguilera-Morales S, Tapia O, Stoppani AO. The chemotherapy of Chagas' disease: an overview. Mini reviews in medicinal chemistry. 2005; 5(5): 499-519.
- Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti MD, Serra G, Pippia P. (-)-linalool produces antinociception in two experimental models of pain. Eur. J. Pharmacol. 2003; 460: 37-41.
- Pelizzaro-Rocha KJ, Tiuman TS, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. Phytomedicine. 2010; 18(1): 36-39.
- Perrin DD, Armarego WLF, Perrin DR. Purification of Laboratory Chemicals. Pergamon, New York. 1980.
- Pichersky E, Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in plant science. 2000; 5(10): 439-445.
- Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2009; 11(4): 465-472.

- Pinto AC, Braga WF, Rezende CM, Garrido FMS, Veiga Júnior VF, Bergyer L, Patitucci, ML, Antunes AC. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Duke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. J Braz Chem Soc. 2000; 11: 355-360.
- Polanco-Hernández G, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Rosado ME, Guzmán-Marín E, Acosta-Viana KY, et al. Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against *Trypanosoma cruzi*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013: 6 pp.
- Quijano-Hernandez I., Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. Human vaccines. 2011; 7(11): 1184.
- Rassi AJr, Rassi A, Rezende JD. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012; 26: 275–91
- Rassi JrA, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. The Lancet. 2010; 375(9723): 1388-1402.
- Rates SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2001; 11(2): 57-69.
- Rodriguez-Esrich S, Popa D, Jimeno C, Vidal-Ferran A, Pericàs MA. (S)-2-[(R)-fluoro(phenyl)methyl]oxirane: a general reagent for determining the e of alpha-chiral amines. Organic Letters. 2005; 7: 3829 – 3832
- Romero AL. Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração Absoluta de Terpenos. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007; 222p.
- Sachetti CG, Fascineli ML, Sampaio JA, Lameira OA, Caldas ED. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). Revta Bras. Farmacognosia. 2009; 19(4): 937-941.
- Sain S, K Naoghare P, Saravana Devi S, Daiwile A, Krishnamurthi K, Arrigo P, Chakrabarti T. Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from *Aegle Marmelos*, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents). 2014; 13(1): 45-55.
- Santangelo EM, Zarbin PH, Cass QB, Ferreira JT, Corrêa AG. Synthesis of the four possible stereoisomers of N-2'-methylbutyl-2- methylbutylamide, the sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* westwood. Synthetic Communications, New York. 2001; 31(23): 3685-3698.
- Santos AOD, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008a; 103(3): 277-281.

- Santos AOD, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. Journal of ethnopharmacology. 2008b; 120(2): 204-208.
- Santos AOD, Costa MA, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, da Veiga-Júnior VF, de Souza Lima MM, Nakamura CV. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. Experimental parasitology. 2011; 129(2): 145-151.
- Sanz-Biset J, Campos-de-la-Cruz J, Epiquin-Rivera MA, Caiguerl S. A first survey on the medicinal plants of the *Chazuta valley* (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology. 2009;122(2): 333-362.
- Sartorelli P, Carvalho CS, Reimo JQ, Lorenzi H, Tempone AG. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. Planta medica. 2010; 76(13): 1454-1456.
- Schmidt TJ, Brun R, Willuhn G, Khalid SA. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. Planta medica. 2002; 68(08): 750-751.
- Schmidt TJ, Nour AM, Khalid SA, Kaiser M, Brun R. Quantitative structure–antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. Molecules. 2009; 14(6): 2062-2076.
- Schmidt TJ, Kaiser M, Brun R. Complete structural assignment of serratol, a cembrane-type diterpene from *Boswellia serrata*, and evaluation of its antiprotozoal activity. Planta medica. 2011; 77(08): 849-850.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. Memrias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007; 102:75-86.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta tropica. 2010; 115(1): 14-21.
- Schofield CJ, Dias JCP. The southern cone initiative against Chagas disease. Advances in Parasitology. 1999; 42: 1-27.
- Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Pharmaceutical statistical. 2011; 10: 128–134.
- Silva LD, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. Biol. 1953; 20 (29) 191-267.
- Silva MS, Tavares JF, Queiroga KF, Agra MF, Barbosa-Filho JM, Almeida JRGS, Silva SAS. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). Qumica Nova. 2009; 32 (6): 1566-1570.
- Souza-Brito AR, Souza Brito AA. Forty years of Brazilian medicinal plant research. Journal of Ethnopharmacology. 1993; 39(1): 53-67.

- Souza JPB, Brancalion APS, Souza AB, Turatti ICC, Ambrósio SR, Furtado NJC, Lopes NP, et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011; 54(4): 653-659.
- Takeda GKF, Prado Júnior JC. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana de *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1974; 8: 75-81.
- Tappin MR, Pereira JF, Lima LA, Siani AC, Mazzei JL, Ramos MF. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*. 2004; 27(2): 236-240.
- Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*. 2011; 24(3): 592-630.
- The Lancet. Neglected tropical diseases: becoming less neglected. 2014; 383(9925): 269.
- Theis N, Lerdau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*. 2003; 164(S3): S93-S102.
- Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current opinion in plant biology*. 2006; 9(3): 297-304.
- Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, et al. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Planta medica*. 2002; 68(09): 808-812.
- Tung YT, Chua MT; Wang SY, Chang ST. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresour. Technol*. 2008; 99: 3908-3913.
- Uchiyama N, Matsunaga K, Kiuchi F, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2002; 50(11): 1514-1516.
- Uchiyama N, Kiuchi F, Ito M, Honda G, Takeda Y, Khodzhimatov OK, Ashurmetov OA. New icetexane and 20-norabietane diterpenes with trypanocidal activity from *Dracocephalum komarovi*. *Journal of natural products*. 2003; 66(1): 128-131.
- Uchiyama N, Kabututu Z, Kubata K, Kiuchi F, Ito M, Nakajima-Shimada J, et al. AntiChagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005; 49(12): 5123-5126.
- Uchiyama N, Kiuchi F, Ito M, Honda G, Takeda Y, Khodzhimatov OK, Ashurmetov OA. Trypanocidal constituents of *Dracocephalum komarovi*. *Tetrahedron*. 2006; 62(18): 4355-4359.
- Uchiyama N. AntiChagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of health science*. 2009; 55(1): 31-39.

- Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003; 19 (11): 495-501.
- Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2010; 115(1-2):55-68.
- Vasconcelos AFF, Godinho OES. Uso de metodos analíticos convencionados no estudo de autenticidade do óleo de copaíba. *Quim Nova.* 2002; 25: 1057-1060.
- Veiga-Junior, VF, Patitucci ML, Pinto AC. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quim Nova.* 1997; 20: 612-615.
- Veiga-Junior, VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova.* 2002; 25(2): 273-286.
- Veiga-Junior, VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura. *Química nova.* 2005; 28(3): 519-528.
- Veiga-Junior VF, Zunino L, Patitucci ML, Pinto AC, Calixto JB. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2006; 58(10): 1405-1410.
- Veiga-Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. 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.* 2007; 112(2): 248-254.
- Vidal GM, Fonseca MG, Zarbin PH. Enantioselective synthesis and absolute configuration of the sex pheromone of *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Tetrahedron Letters.* 2010; 51(51): 6704-6706.
- Vieira RC, Bombardiere E, Oliveira JJ, Lino-Júnior RS, Brito LA, Junqueira-Kipnis AP. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesq. Vet. Bras.* 2008; 28(8).
- WHO. World Health Organization. Integrated control of the neglected tropical diseases. Carter Center presented to the Global Health and the United Nations meeting, Atlanta. 2008; 5 pp.
- WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. 2013; pp 6.
- WHO. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. 2010; pp. 172. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
- Yang X, Lederer C, McDaniel M, Deinzer M. Hydrolysis products of caryophyllene oxide in hops and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1993; 41(11): 2082-2085.

APÊNDICE A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz/ CDCl_3) do ácido 19-*ent*-cauranóico. **Espectro 1.** RMN de ^1H (400 MHz/ CDCl_3) do ácido 19-*ent*-cauranóico

Espectro 2. Expansão do espectro 1

APÊNDICE B - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do ácido 19-*ent*-cauranóico. **Espectro 3.** RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do ácido 19-*ent*-cauranóico.

Espectro 4. Expansão do espectro 3.

APÊNDICE C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz / CDCl_3) do ácido *ent*-copálico.

APÊNDICE D - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz / CDCl_3) do ácido *ent*-copálico.

APÊNDICE E - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz / CDCl_3) do 4,9,12,12-tetrametil-5-oxatriciclo[8.2.0.0]dodecano.

APÊNDICE F. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do 4,9,12,12-tetrametil-5 oxatriciclo [8.2.0.0]dodecano.

APÊNDICE G - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz/ CDCl_3) do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol.

APÊNDICE H - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol.

Apêndice I - Espectro de HSQC do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol (400/100 MHz, CDCl₃).

Apêndice J - Espectro de HMQC do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol (400/100 MHz, CDCl₃).

APÊNDICE K - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz/ CDCl_3) do 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo[7,2,0]undecan-5-ol.

APÊNDICE L - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz / CDCl_3) do 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo[7,2,0]undecan-5-ol.

APÊNDICE M - Espectro de HSQC do 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo[7,2,0]undecan-5-ol (400/100 MHz, CDCl₃).

APÊNDICE N - Espectro de HMQC do 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo[7,2,0]undecan-5-ol (400/100 MHz, CDCl₃).

APÊNDICE O - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz / CDCl_3) do Acetato de 4,11,11-trimetil-8-metienobicyclo[7,2,0]undec-3-en-5-ila.

APÊNDICE P. - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do Acetato de 4,11,11-trimetil-8-metienobiciclo[7,2,0]undec-3-en-5-ila.

APÊNDICE Q - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz / CDCl_3) do Acetato de 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo [7,2,0]undecan-5-ila

APÊNDICE R - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz / CDCl_3) do Acetato de 10,10-dimetil-2,6-dimetilenobiciclo [7,2,0]undecan-5-ila.

APÊNDICE S - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz / CDCl_3) do 5-iodo-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-eno.

APÊNDICE T - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ CDCl_3) do 5-iodo-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-eno