



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ULTRAESTRUTURAL E NANOESTRUTURAL
DO COPAL DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril* L.) E ESTUDO DAS
MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ESTRUTURAIS RESULTANTES DA INTERAÇÃO
DO SOLUBILIZADO DO COPAL COM LIPOSSOMAS**

Jorge Alex Taquita Melo

BRASÍLIA

2017

JORGE ALEX TAQUITA MELO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ULTRAESTRUTURAL E NANOESTRUTURAL
DO COPAL DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril* L.) E ESTUDO DAS
MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ESTRUTURAIS RESULTANTES DA INTERAÇÃO
DO SOLUBILIZADO DO COPAL COM LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

ORIENTADOR:

Profº Drº. LUCIANO PAULINO DA SILVA

BRASÍLIA

2017

JORGE ALEX TAQUITA MELO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ULTRAESTRUTURAL E NANOESTRUTURAL
DO COPAL DE JATOBÁ (*Hymenaea courbaril* L.) E ESTUDO DAS
MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ESTRUTURAIS RESULTANTES DA INTERAÇÃO
DO SOLUBILIZADO DO COPAL COM LIPOSSOMAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº Drº. Luciano Paulino da Silva

(Orientador)

Profª Drª. Marcella Lemos Brettas Carneiro

(Membro Titular)

Profº Drº. Marcelo Henrique Soller Ramada

(Membro Titular)

Profª Drª. Cínthia Caetano Bonatto

(Membro Suplente)

Brasília-DF, 13 de dezembro de 2017

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a toda a minha família, especialmente aos meus pais João e Rosana e a minha sogra Liliane que sempre me incentivaram a continuar estudando e são um referencial importante de apoio para minha esposa Maria Amélia e seus queridos e amados netos Ana e Rafael.

É claro que também agradeço e dedico este trabalho a minha esposa Maria Amélia A. Estrela, que sempre trabalhou e estudou esforçadamente para o bem de nossos filhos e família. Também agradeço aos meus filhos Ana Estrela Melo e Rafael Estrela Melo, que são crianças amáveis e que sempre me deram orgulho e incentivo na vida.

Agradeço a todo corpo de funcionários e docentes da Universidade de Brasília que contribuíram para minha formação acadêmica. Um agradecimento especial aos Professores(as) do Instituto de Química (UnB-IQ) Jurandir Rodrigues, Antônio Guaritá, Denise Imbroisi, Gaston Alfredo, Marcelo Henrique Sousa, e Fátima Barreto. Aos Professores(as) do Instituto de Biologia (UnB-IB): Sônia Nair Bão e João Paulo Figueiró Longo, Graziella Anselmo Joanitti, Marcella Lemos Brettas Carneiro e colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB. Aos professores do Instituto de Física (UnB-IF): Sebastião William da Silva, José Antônio Huamani Coaquira e Paulo César de Moraes.

Agradeço aos colegas da Embrapa Cenargen, aos amigos e amigas do LEM, LSA e BIOIMAGEM onde passo e divido a maior parte do meu tempo trabalhando. Fica um Super-agradecimento aos meus companheiros de trabalho mais antigos: Carlos Bloch, que sempre me incentivou a continuar evoluindo profissionalmente, mentalmente e espiritualmente; Não esquecendo também (em

ordem cronológica) da Maura Vianna, Natasha Santos, Clarissa Castro, Guilherme Dotto, José Roberto, José de Ribamar, Vladimir Costa, Ana Cristina Gomes, Marcelo Porto, Gabriella Magarelli, Daniel Sifuentes, Marcelo Ramada, André, Beatriz e Heitor.

Fica também registrado um agradecimento aos colegas do LNANO: Cíntia, Eduardo Fernandes, José Cardoso, Ariane, Rodrigo, Douglas, Ivy, Tatiane e Jéssika. Ao Profº Luciano Paulino da Silva fica um agradecimento especial por também ter me incentivado e ajudado bastante na conclusão desta importante etapa de minha formação acadêmica e na minha formação como pesquisador, cientista e ser humano.

Por fim, agradeço ao cara lá de cima que sempre se esforça para nos guiar pelo caminho do bem e da paz, tenha o nome que ele tiver: Deus, Javé, Jesus Cristo, Alá, Maomé, Oxalá, Shiva, Brahma ou Buda.

Obrigado!!!

*“Um passo à frente e você não está
mais no mesmo lugar.”*

Francisco de Assis França Caldas

Brandão - “Chico Science”

(1966 – 1997)

Resumo

Terpenos são substâncias comumente encontradas em abundância nos óleos essenciais e resinas extraídos de plantas. Assim, os copais e âmbares formados a partir da resina exsudada por algumas espécies de plantas são constituídos por uma mistura complexa de vários terpenoides. No Brasil, as árvores pertencentes ao gênero *Hymenaea*, vulgarmente conhecidas como jatobá, produzem copais com propriedades químicas e biológicas variadas e, por esse motivo, foi objeto do presente estudo. Na primeira etapa foram avaliadas as propriedades morfológicas e estruturais do copal de jatobá por meio das microscopias eletrônicas de varredura (MEV), transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA); e realizada a caracterização molecular por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) e espectroscopia Raman. A caracterização morfológica do copal de jatobá permitiu observar uma organização uniforme da estrutura e a caracterização molecular possibilitou identificar que o β -cariofileno, uma molécula da família dos sesquiterpenoides, é o componente molecular majoritário desta amostra. O β -cariofileno é uma substância insolúvel em meio aquoso com algumas propriedades farmacológicas e terapêuticas correlacionadas a atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Em função disso, a avaliação dos possíveis efeitos do β -cariofileno, ou mesmo do copal de plantas como a *H. courbaril*, em membranas celulares, constitui uma abordagem relevante e, dentre os modelos indicados para tais estudos, podem ser citados aqueles envolvendo miméticos de membranas celulares, como lipossomas. Os lipossomas são vesículas com propriedades anfífilas formadas a partir de fosfolípidos. São estruturas biocompatíveis, difundem-se facilmente no sistema circulatório, são facilmente absorvidos pelas células dos procaríotos e eucariotos, além da sua estrutura compartimentalizada atuar como uma superfície protetora. Estas características possibilitam que os lipossomas atuem como um importante meio de veiculação e de biodisponibilidade de substâncias polares e apolares; além de modelo adequado para estudo de processos de interação de compostos membranoativos. Técnicas calorimétricas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC) fornecem importantes informações quanto às transições de fase lipídicas em modelos de membrana biomiméticas durante os processos de interação destas com diversos tipos de moléculas, dentre elas os terpenoides. Dessa forma, avaliar os efeitos destas interações é de extrema importância para caracterizar a estabilidade e os mecanismos de ação envolvidos nestes processos. Assim, DSC e ITC foram utilizadas para avaliar as alterações no grau de cooperatividade dos fosfolípidos e os processos de troca de calor, além do espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizado nas medições e distribuições do tamanho dos lipossomas. Os resultados obtidos indicam que há interação entre os terpenos e os lipossomas, caracterizado pelo decréscimo do diâmetro hidrodinâmico e grau de cooperatividade dos lipossomas estudados.

Palavras-chave: Terpenos, copal, β -cariofileno, lipossomas, calorimetria, microscopia eletrônica e microscopia de força atômica.

Abstract

Terpenes are substances commonly found in abundance in essential oils and resins extracted from plants. Thus, the copal and ambers formed from exudate resin of some species of plants are made up of a complex mixture of several terpenoids. In Brazil, the trees belonging to the genus *Hymenaea*, commonly known as jatobá, produce copal with chemical and biological properties and for this reason was the subject of the present study. Firstly were evaluated the morphological and structural properties of the copal of jatobá through scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM); and molecular characterization performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and Raman spectroscopy. The morphological characterization of the copal of jatobá allowed to observe a uniform organization structure and molecular characterization made it possible to identify the β -caryophyllene, a molecule of sesquiterpenoid family, as the major component of this sample. The β -caryophyllene is a substance insoluble in aqueous media with some pharmacological and therapeutic properties correlated to anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities. Because of this, the evaluation of the possible effects of β -caryophyllene or even of the copal of plants as *H. courbaril* in cell membranes is a relevant approach. One of the models listed for such studies including mimetic cell membrane, the liposomes. Liposomes are vesicles with amphiphilic properties formed from phospholipids. They are biocompatible structures, spread easily in the circulatory system, easily absorbed by the cells of prokaryotes and eukaryotes, as well as your structure-compartmentalized act as a protective surface. These features allow liposomes to act as an important means of conveyance and bioavailability of polar and nonpolar substances; In addition it is suitable model to study processes of interaction of membrane active compounds. Calorimetric techniques such as differential scanning calorimetry (DSC) and isothermal titration calorimetry (ITC) provide important information about the lipid phase transitions in biomimetic membrane models during the processes of interaction of these with different kinds of molecules, among them the terpenoids. Thus, evaluate the effects of these interactions is important to characterize the stability and the mechanisms of action involved in these processes. Thus, DSC and ITC were respectively used to assess changes in the degree of cooperativity and heat exchange processes, in addition to the dynamic light scattering (DLS) used in the measurements and size distributions of liposomes. The results indicate that there is interaction between the terpenes and liposomes, characterized by the decrease of the hydrodynamic diameter and degree of cooperativity of liposomes.

Keywords: Terpenes, copal, β -caryophyllene, liposomes, calorimetry, electronic microscopy and atomic force microscopy.

Lista de figuras

Figura 1. Rotas de biossíntese dos terpenos pela via do Acetato-Mevalonato e via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP).	5
Figura 2. Rotas de biossíntese dos precursores de terpenos GPP, FPP e GGPP via combinação nas moléculas de IPP e DMAPP.	6
Figura 3. Estrutura química do isopreno (2-metil-1,3-butadieno).	7
Figura 4. Exemplo das uniões do tipo cabeça-cauda entre as três unidades de isoprenos no sesquiterpeno conhecido como farnesol.	7
Figura 5. Monoterpeno em formato de anel, conhecido como α -felandreno, formado pela união de duas unidades de isoprenos.	8
Figura 6. Estrutura química do β -cariofileno, componente majoritário no copal da espécie <i>Hymenaea courbaril</i> .	9
Figura 7-A: Representação da molécula de β -cariofileno no plano horizontal. 7-B: Representação no plano horizontal com os átomos de carbono numerados.	15
Figura 8-A: Molécula de β -cariofileno em três dimensões. Rotação: 0°. Referência C4, C9, C11 e C10. 8-B: Rotação: 90°. Referência C9 e C11. Figura 8-C: Rotação: 180°. Referência C9, C4, C10 e C11. 8-D: Rotação: 360°. Referência C4 e C10.	17 18
Figura 9-A: Representação da molécula do óxido de β -cariofileno. 9-B: Representação da molécula do humuleno.	20
Figura 10. Representação da molécula do β -cariofileno da perspectiva dos carbonos C6, C5 e C12.	20
Figura 11-A: Representação planar da molécula do cariolanol. 11-B: Representação em três dimensões da molécula do cariolanol.	21
Figura 12: Exemplo da estrutura geral de um fosfolípídeo.	23
Figura 13: Exemplo de formação de estruturas micelares com bicamada lipídica.	23
Figura 14: Representação esquemática dos principais componentes de um MEV e MET.	31
Figura 15. Representação esquemática dos principais componentes de um MFA.	32

Figura 16: Desenho esquemático dos principais componentes de um CG-MS.	33
Figura 17. Desenho esquemático dos principais componentes de um microscópio Raman	35
Figura 18. Desenho esquemático de um equipamento de DLS.	36
Figura 19. Desenho esquemático de uma célula calorimétrica, onde uma diferencia de potencial (DP) é aplicada durante o aquecimento das células.	38
Figura 20. Exemplo de um termograma e as principais informações fornecidas durante um evento termicamente induzido de uma substância.	39
Figura 21. Desenho esquemático de uma célula calorimétrica de ITC. Adaptado de Malvern Instruments.	41
Figura 22. Fluxograma metodológico exemplificando as etapas de preparação das amostras e métodos de análises empregados.	44
Figura 23-A: Amostra de copal de jatobá bruto utilizado no estudo. 23-B: Amostra do copal de jatobá fraturada para visualização da parte interna, onde pode-se constatar o aspecto vítreo da amostra.	53
Figura 24. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MFA em modo contato. Área de varredura 5 μm \times 5 μm .	54
Figura 25-A a G: Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com magnificação de 40 \times , 75 \times , 450 \times , 8.000 \times , 23.000 \times , 50.000 \times e 60.000 \times .	55 56
Figura 26-A e 26-B : Imagem de secção ultrafina do copal de jatobá adquirida por MET com magnificação de 140.000 \times e 250.000 \times .	57 58
Figura 27. Cromatograma de massa obtido por CG-MS da amostra do copal de Jatobá.	59
Figura 28. Espectro Raman da amostra do copal de jatobá adquirido com laser de 785 nm.	61
Figura 29. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos somente por DMPC sem adição do solubilizado do copal de jatobá.	63
Figura 30. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,1% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá.	63

- Figura 31.** Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,3% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá. 63
- Figura 32.** Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,5% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá. 63
- Figura 33-A.** Comparativo entre os Lipossomas constituídos somente por DMPC e DMPC + solubilizado do copal de jatobá nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,5% (m/m). **33-B.:** Gráfico ilustrando a diminuição do d(H) de acordo com o aumento da concentração do solubilizado do copal. 64
- Figura 34.** Termograma adquirido por DSC a partir de suspensão de lipossomas constituídos somente por DMPC. 65
- Figura 35.** Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,1%. 66
- Figura 36.** Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,3%. 66
- Figura 37.** Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol na concentração de 0,5%. 67
- Figura 38-A.** Gráfico ilustrando que os valores de ΔH_{VH} são inversamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal de jatobá. **38-B:** Gráfico ilustrando que os valores de $\Delta T_{1/2}$ são diretamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal de jatobá. 68
- Figura 39.** Termograma adquirido por ITC entre lipossomas constituídos por DMPC (titulado) e lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,5% (titulante). 70
- Figura 40-A.** Estrutura do cariolanol destacando a funcionalização pelo processo de hidroxilação (destacado em vermelho) e rearranjo das duplas ligações (destacado em azul). **40-B.:** Representação da molécula do cariolanol em 3D, destacando as mesmas modificações da figura 40-A. 72
- Figura 41.** Ilustração do processo de identificação das frações via placa de TLC após fracionamento da amostra em coluna de cromatografia aberta. Ponto 1: β -cariofileno; Ponto 2: óxido do β -cariofileno; e Ponto 3: cariolanol. 73
- Figura 42-A.** Espectro de massa total da fração contendo o cariolanol após purificação em coluna de cromatografia aberta.**42-B:** Ampliação da região do espectro em destaque na cor vermelha da Figura 42-A, destacando a massa do cariolanol com a adição de 1 próton. 75

Figura 43. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol na concentração de 0,1%. 76

Figura 44. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol na concentração de 0,3%. 76

Figura 45-A. Gráfico ilustrando a comparação dos valores de ΔH_{NH} para as frações molares do copal de jatobá e cariolanol. 77
45-B: Gráfico ilustrando a comparação dos valores de $\Delta T_{1/2}$ para as frações molares do copal de jatobá e cariolanol. 78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos terpenos.	7
Tabela 2. Tabela de patentes de fármacos desenvolvidos com a utilização de monoterpenos e sesquiterpenos	13
Tabela 3. Outras atividades farmacológicas de alguns terpenos.	14
Tabela 4. Registros de patentes com a utilização do Cariofileno desde o ano de 2014.	15
Tabela 5. Estiramentos característicos da molécula de cariofileno por espectroscopia Raman.	61
Tabela 6. Compilação dos dados calorimétricos adquiridos por meio de DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá em diferentes concentrações.	67
Tabela 7. Compilação dos dados calorimétricos adquiridos por meio de DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol em diferentes concentrações.	77

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

μm – micrômetro (1×10^{-6} m)

μM – micromolar (1×10^{-6} m)

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

3D – três dimensões

C - carbono

CB1 – sistema de receptores endocanabinoides localizados nos terminais nervosos pré-sinápticos

CB2 - sistema imunológico periférico de receptores endocanabinoides

CG-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, derivada do termo em inglês: GC-MS - *gas chromatography coupled to mass spectrometry*

D - coeficiente translacional de difusão

d(H) – diâmetro hidrodinâmico

DLS - *dynamic light scattering*

DMAPP - *isopentenyl diphosphate*

DMPC - dimiristoil fosfatidilcolina (1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina)

DP – diferença de potencial

DSC – *differential scanning calorimetry*

DXP - 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato

ER – elétrons retroespalhados

ES – elétrons secundários

g – grama

GPP – trans-geranilpirofosfato

H – hidrogênio

h – hora

HPLC – *high performance liquid chromatography*

IPP - *isopentenyl diphosphate*

IR – espectroscopia no infravermelho

ITC – *isothermal scanning calorimetry*

k - constante de Boltzmann ($1,38064852 \times 10^{-23}$ m² kg s⁻² K⁻¹)

kV – quilovolts

m/m – relação massa/massa

MAV – ácido mevalônico

MB – movimento browniano

MEP – metileritritol fosfato

MET - microscopia eletrônica de transmissão, derivada do termo em inglês: TEM - *transmission electron microscopy*

MEV - microscopia eletrônica de varredura, derivada do termo em inglês: SEM - *scanning electron microscopy*

MFA - microscopia de força atômica, derivada do termo em inglês: AFM - *atomic force microscopy*

mL – mililitros (1×10^{-3} L)

mm – milímetros (1×10^{-3} m)

n – valor de unidade cooperativa

n – viscosidade

NIST – *national institute of standards and technology*

nm – nanômetros (1×10^{-9} m)

PBS – tampão fosfato salina

PdI - índice de polidispersividade

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm – rotações por minuto

s – segundos

T – temperatura

TLC – *thin layer chromatography* – cromatografia de camada fina/delgada

T_m – *melting transition*

UV - ultravioleta

v/v – relação volume/volume

XDR – difração de raios-X

ΔC_p – capacidade calorífica à pressão constante

ΔH_{cal} – entalpia calorimétrica

ΔH_{vH} – entalpia de van't Hoff

ΔS - entropia

$\Delta T_{1/2}$ - largura do pico a meia altura

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 - Resinas de plantas - Amostras de âmbar e copais.....	2
1.2 - Biossíntese e classificação dos terpenos.....	4
1.3 - Caracterização química e estrutural dos âmbar e copais.....	8
1.4 - Importância dos terpenos nos setores industriais.....	10
1.5 - Atividade biológica dos terpenos.....	11
1.6 - Características moleculares do β -cariofileno.....	15
1.7 - Características biológicas da molécula de β -cariofileno.....	19
1.8 - Membranas biológicas.....	22
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	27
3.1 - Objetivo geral:.....	28
3.2 - Objetivos específicos:.....	28
4. Material e Métodos:.....	29
4.1 - Fundamentação teórica e princípios das técnicas empregadas.....	30
4.1.1 - Microscopias Eletrônicas e Microscopia de Força Atômica.....	30
4.1.2 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-MS).....	33
4.1.3 - Espectroscopia Raman.....	34
4.1.4 - Espalhamento de luz dinâmico - <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS).....	35
4.1.5 - Calorimetria exploratória diferencial - <i>Differential Scanning Calorimetry</i> (DSC).....	38
4.1.6 - Calorimetria de titulação isotérmica - <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (ITC).....	41
4.2 - Material.....	42
4.3 - Métodos.....	43
5. Resultados e Discussão.....	52
5.1 - Caracterização da amostra do copal de jatobá.....	53
5.1.1 - Aspectos visuais.....	53
5.1.2 - Aspectos microscópicos.....	54
5.1.3 - Análise da composição fitoquímica do copal de jatobá por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	59
5.1.4 - Análise do copal de jatobá por espectroscopia Raman.....	61
5.2 - Efeitos do solubilizado do copal de jatobá em lipossomas.....	62
5.2.1 - Análise por espalhamento de luz dinâmico dos lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá.....	62
5.2.2 - Análise calorimétrica dos lipossomas modificados com o solubilizado do copal de Jatobá por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	65
5.2.3 - Síntese do cariolanol e análise calorimétrica dos lipossomas modificados com o cariolanol por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	71
6 - Conclusão.....	80
7 - Referências Bibliográficas.....	82
8 - Anexos.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Resinas de plantas - Amostras de âmbar e copais

Secreções de plantas são produzidas por um complexo processo de formação que envolve a estrutura da glândula secretora - que podem ser internas ou externas; o tipo de exsudado produzido; e a sua função (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Os exsudados formados em plantas, também conhecidos como resinas, apresentam a consistência de um líquido viscoso e a depender da espécie e das condições ambientais, podem permanecer em estado gelatinoso ou solidificar devido a processos de oxidação no meio ambiente em períodos que podem variar entre dias ou semanas (LAMBERT, JOSEPH B; SANTIAGO-BLAY; ANDERSON, 2008).

Estudos botânicos e geológicos classificam as resinas em âmbar e copais. Ambas são formadas quando um agente externo (como por exemplo, um inseto) causa danos ao córtex (casca) de algumas árvores, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Hymenaea*, *Trachylobium* e *Pinus* (GIGLIARELLI et al., 2015; KHOO; OEHLISCHLAGER; OURISSON, 1973). Assim, como estratégia de proteção, a planta exsuda esta resina na região onde o dano foi causado.

Ainda de acordo com a geologia, seguindo parâmetros de datação geológica, as resinas são classificadas de acordo com o período de sua existência. Os âmbar são resinas fossilizadas em períodos compreendidos de 3 a 340 milhões de anos, e os copais são resinas semi-fossilizadas há algumas centenas de anos ou até menos (LAMBERT, J. B. et al., 2012). Atualmente, a geologia classifica o âmbar como uma gema, a única que possui origem vegetal, dentre outras gemas orgânicas como o marfim, a pérola e o coral, todas de origem animal.

As resinas fossilizadas são classificadas como âmbar “verdadeiro” e copal (BRANCO, 2008). O âmbar “verdadeiro” é tipicamente relacionado com a resina do *Pinus succinites* e, por ser derivado desta planta, é conhecido como succino. Os principais depósitos de âmbares estão localizados na costa do Mar Báltico; na República Dominicana; nos Estados Unidos da América; na região norte da China e Mianmar; e no Japão (região de Kuji) (YOSHIHARA; MAEDA; IMAI, 2009).

Já os copais são formados por resinas de plantas que ocorrem em vários continentes. Nas regiões tropicais das Américas Central e do Sul e região oeste da Índia, as árvores do gênero *Hymenaea*, pertencentes à família *Fabaceae* e subfamília *Caesalpinoideae*, são bem difundidas. No Brasil, as árvores deste gênero estão concentradas no Bioma Cerrado, nos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins, e todas as regiões abrangidas pela Floresta Amazônica (LANGENHEIM, JEAN H.; LEE, 1974; LORENZI, 2002; SOUZA; FUNCH; DE QUEIROZ, 2014). Das dezesseis diferentes espécies do gênero *Hymenaea*, a mais difundida no Brasil é a espécie *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá, mas a depender da região, também existem outros nomes como: jatobá-verdadeiro, jutaí, jataí, cuapinol, guapinol, locust, kawanari, rode, lokus e algarrobo (ROSSI, 2008).

É importante salientar que o termo resina é frequentemente utilizado para caracterizar seivas ou exsudados aromáticos de plantas e distinguem-se de outros exsudados como gomas, gelatinas, ceras, óleos e látex pela sua constituição química. Uma definição primária para resinas de plantas as caracteriza como uma mistura lipossolúvel de terpenoides voláteis e não voláteis. Outra definição adotada comumente é aquela que caracteriza as resinas como misturas de compostos fenólicos secundários secretados em estruturas internas especializadas ou na superfície das plantas (GIGLIARELLI et al., 2015).

1.2 - Biossíntese e classificação dos terpenos

Terpenos, também denominados como terpenóides ou isoprenoídes, são substâncias comumente encontradas em óleos essenciais extraídos de plantas. Em levantamento realizado por Connolly e Hill (1991) estimava-se que existiam cerca de 30 mil compostos na família dos terpenos. Em outra revisão atualizada realizada por Maimone e Baran (2007) este número já havia sido atualizado para 55 mil compostos (MAIMONE; BARAN, 2007; STEVENS, 1992). Esta diversidade de terpenos deve-se à ação de enzimas da classe das terpenosintases, as quais são responsáveis pela conversão da série de homólogos do prenil difosfatos acíclicos e do esqualeno em várias formas cíclicas e acíclicas (BLOCH, 1965; DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009; ZULAK; BOHLMANN, 2010).

Fundamentalmente, a síntese dos isoprenoides é baseada em dois compostos químicos isômeros de cinco átomos de carbono. O primeiro é o difosfato de isopentenila (do termo em inglês: *isopentenyl diphosphate* – abreviado como IPP) e o segundo é o difosfato de dimetilalila (do termo em inglês: *dimethylallyl diphosphate* – abreviado como DMAPP). O IPP e o DMAPP são sintetizados biologicamente por dois mecanismos (Figura 1), a via do acetato-mevalonato, também conhecida como rota do ácido mevalônico (MAV) e pela via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), também conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP) (KIRBY; KEASLING, 2009; PICKENS; TANG; CHOOI, 2011).

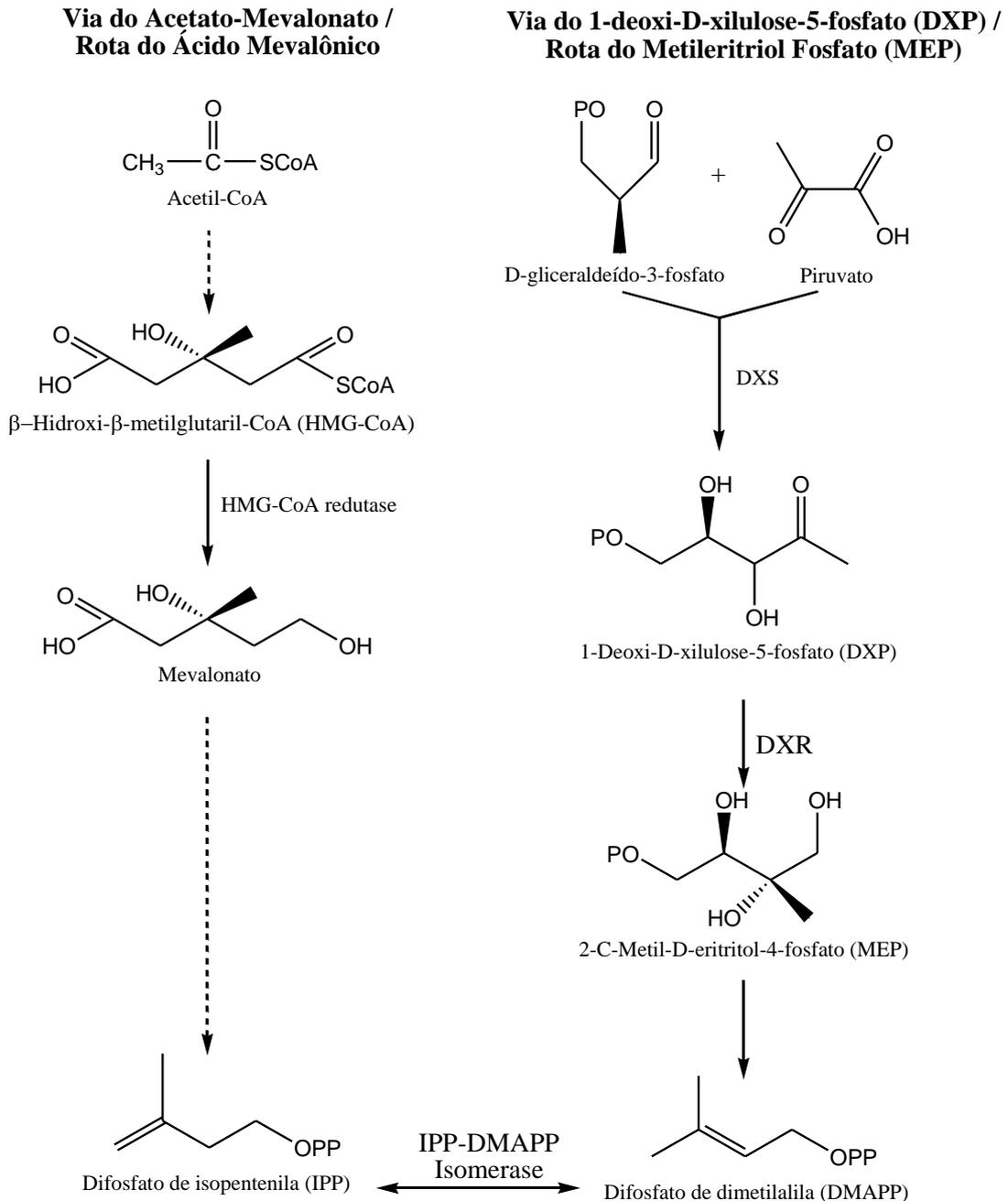


Figura 1. Rotas de biossíntese dos terpenos pela via do acetato-mevalonato e via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Com adaptações (KIRBY; KEASLING, 2009).

Ao final das vias do acetato-mevalonato e da DXP, os produtos IPP e DMAPP são combinados pela ação da IPP-DMAPP Isomerase em uma nova molécula com dez carbonos (C₁₀) denominada como trans-geranilpirofosfato (GPP) que após processos de conversão dão origem a vários monoterpenos. Por sua vez, é adicionada outra molécula de IPP ao GPP, gerando uma nova molécula de quinze carbonos (C₁₅) denominada como farnesil difosfato (FPP), que é precursora da

maioria dos sesquiterpenos. Novamente há uma nova adição de uma molécula de IPP ao FPP, gerando uma nova molécula com vinte átomos de carbono (C_{20}) denominada geranylgeranyl difosfato (GGPP), que é precursora de vários diterpenos (Figura 2) (KIRBY; KEASLING, 2009). Ao final, as moléculas de FPP e GGPP podem sofrer um processo de dimerização, resultando em moléculas com trinta carbonos (C_{30}) ou quarenta carbonos (C_{40}), denominadas triterpenos e tetraterpenos, respectivamente (DEWICK, 2009; KIRBY; KEASLING, 2009).

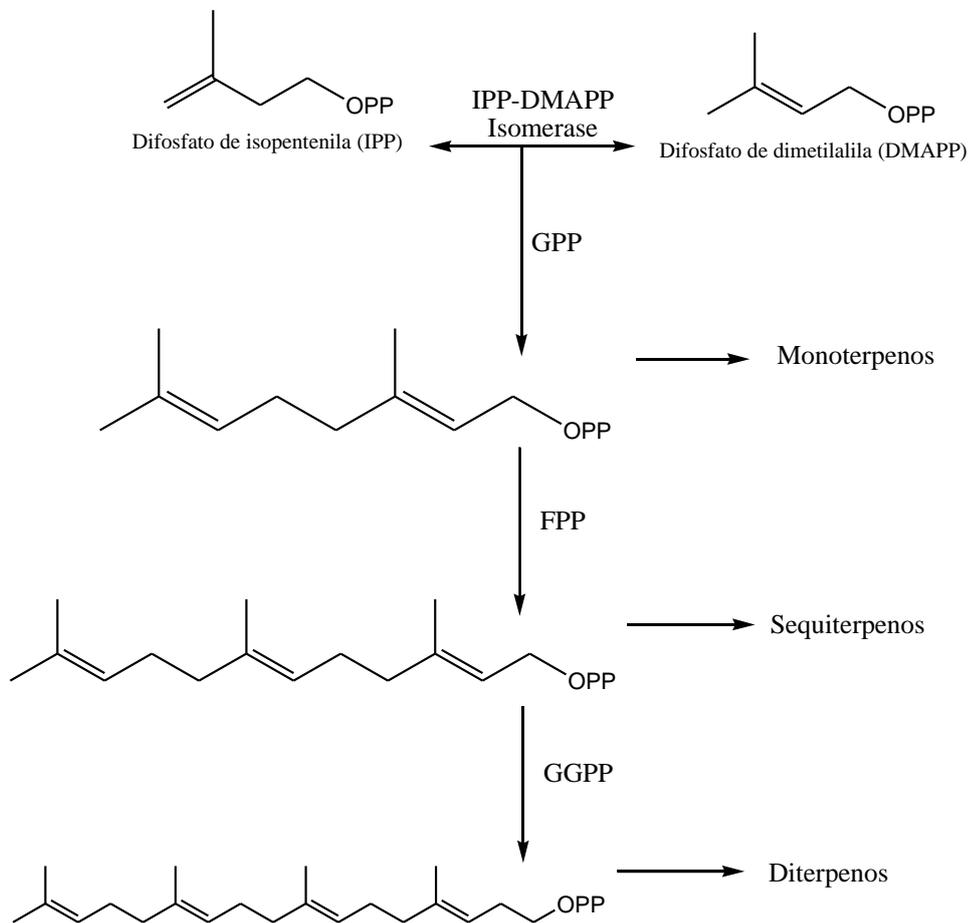


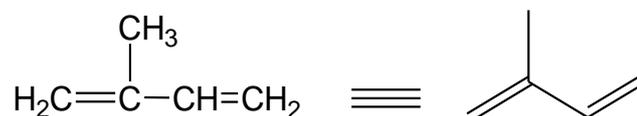
Figura 2. Rotas de biossíntese dos precursores de terpenos GPP, FPP e GGPP via combinação nas moléculas de IPP e DMAPP. Com adaptações (KIRBY; KEASLING, 2009).

Ainda de acordo com o número de unidades de isopreno, os terpenos são quimicamente classificados conforme a tabela 1.

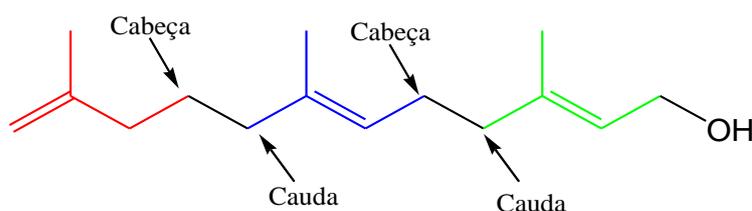
Tabela 1. Classificação dos terpenos

Classe	Unidades de Isopreno	Nº de átomos de carbono
Hemiterpenos	1	5
Monoterpeno	2	10
Sesquiterpeno	3	15
Diterpeno	4	20
Sesterpeno	5	25
Triterpeno	6	30
Tetraterpeno	8	40
Politerpenos	>8	>40

A característica estrutural que distingue os terpenos de outros compostos orgânicos naturais é o composto com cinco carbonos conhecido como isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 3) (LIMA et al., 2016; LIU et al., 2014).

**Figura 3.** Estrutura química do isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

Outra característica importante apresentada pelos terpenos é o tipo de ligação entre as unidades de isoprenos, que é conhecida como união cabeça-cauda (Figura 4) (LIMA et al., 2016).

**Figura 4.** Exemplo das as uniões do tipo cabeça-cauda entre as três unidades de isoprenos no sesquiterpeno conhecido como farnesol.

Além disso, vários terpenos também podem assumir conformações de anéis devido à união de várias unidades de isopreno (Figura 5).

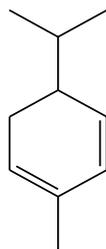


Figura 5. Monoterpeno em formato de anel, conhecido como α -felandreno, formado pela união de duas unidades de isoprenos.

1.3 - Caracterização química e estrutural dos âmbar e copais

Os primeiros estudos sobre a caracterização química dos âmbar e copais foram realizados em 1965, por Jean H. Langenheim a partir de amostras coletadas em vários continentes, as quais foram submetidas a análises por espectroscopia no infravermelho (IR) e difração de raios-X (XDR). Estes estudos indicaram que os materiais estudados eram constituídos majoritariamente por moléculas da classe dos terpenos, incluindo monoterpenoides, diterpenoides, triterpenoides e sesquiterpenoides (LANGENHEIM, JEAN H., 1969; LANGENHEIM, J. H.; BECK, 1965). Trabalhos desenvolvidos pelos grupos de Mills et al (1984) e Grimalt et al (1988) caracterizaram âmbar e copais de várias regiões pelas técnicas de IR e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados corroboraram os dados obtidos por Langenheim (1969) na medida em que as análises também identificaram vários compostos da classe dos terpenoides (GRIMALT et al., 1988; MILLS; WHITE; GOUGH, 1984).

Amostras de âmbar e copais de regiões do México, República Dominicana e Polônia foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (C^{13} RMN) e IR. Os resultados indicaram que os espectros de cada amostra apresentam regiões características específicas que possibilitaram a sua

identificação de acordo com a espécie de árvore que a produziu (CUNNINGHAM et al., 1983; MARTÍNEZ-RICHA et al., 2000). Já Edwards et al (2007) avaliaram comparativamente âmbar e copais quanto às estruturas que foram fossilizadas em seu interior utilizando a técnica da espectroscopia Raman (EDWARDS; FARWELL; VILLAR, 2007). Yoshihara et al (2009), utilizando a espectroscopia de Brillouin correlacionaram os espectros obtidos pela dispersão de Brillouin com espectros de IR demonstrando que esta técnica pode ser utilizada para caracterizar geologicamente o material de maneira não destrutiva (YOSHIHARA et al., 2009).

Copais provenientes da espécie *H. courbaril* também foram analisados por IR, GC-MS e RMN. Foram identificadas a presença dos seguintes sesquiterpenoides: β -cariofileno (26%) (Figura 6), α -sileno (17%), β -sileno (18%), α -copaeno (9%), β -copaeno (5%) e α - e β -humuleno (5%); além de outros diterpenoides menos representativos (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009; KHOO et al., 1973; MARTIN; LANGENHEIM; ZAVARIN, 1972).

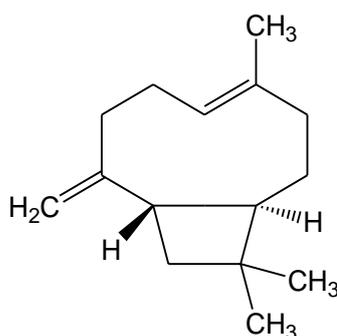


Figura 6. Estrutura química do β -cariofileno, componente majoritário no copal da espécie *Hymenaea courbaril*.

1.4 - Importância dos terpenos nos setores industriais

Os terpenos são representantes de uma grande classe de produtos naturais que tem considerável valor econômico e também diversas aplicações em setores industriais como os de fragrâncias, alimentos, tintas, borrachas e farmacêuticos (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013; GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; SCHWAB; FUCHS; HUANG, 2013).

Uma estimativa da aplicação econômica dos terpenos na indústria farmacêutica foi realizada em 2002 por Wang, Tang e Bidigare. De acordo com os dados destes autores, a movimentação financeira envolvendo derivados de terpenos na indústria farmacêutica foi de aproximadamente US\$ 12 bilhões de dólares. Como exemplos, podem-se citar as drogas anticâncer como o Taxol[®] e antimalárica como a Artemisinina, além de outras drogas derivadas de terpenos que são amplamente difundidas no mercado (WANG, G.; TANG; BIDIGARE, 2005).

Outro exemplo de aplicação comercial que também pode ser citado é o analgésico de aplicação tópica Salonpas[®], que é formulado com mentol (5,7%), canfora (1,12%) e salicilato de metila (6,3%) e que somente nos Estados Unidos da América movimenta anualmente recursos em um montante estimado de US\$ 2 bilhões de dólares (FEUCHT; PATEL, 2010).

No Brasil, em 2005, chegou ao mercado um anti-inflamatório fitoterápico derivado do sesquiterpenóide alpha-humuleno, o Acheflan, que foi desenvolvido pelo laboratório Aché do Brasil (HOHMANN et al., 2016).

No setor industrial em geral e automotivo, outro exemplo de sucesso como um produto derivado de terpenos é um politerpeno, a borracha. A descoberta do processo de vulcanização da borracha por Charles Goodyear foi um marco

importante na indústria. Outros importantes terpenos que também são relevantes para a indústria em geral são: cânfora, mentol, piretrinas, limoneno, carvona, rosina e as lactonas (SCHWAB et al., 2013; ZWENGER; BASU, 2008).

Na indústria alimentícia também estão sendo desenvolvidas pesquisas que avaliam a função destes terpenos e de outros como aditivos alimentares e agentes aromatizantes que tem a finalidade de enriquecer o sabor e aumentar a durabilidade dos alimentos industrializados. Além disso a indústria química faz investimentos que tem por objetivo produzir sinteticamente e em larga escala vários tipos de terpenos para atender à crescente demanda por este tipo de químico (AHAD et al., 2009; ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012; GUIMARÃES et al., 2013).

1.5 - Atividade biológica dos terpenos

Produtos naturais derivados de plantas são utilizados para tratamento médico desde o início da história da humanidade. De fato, as plantas apresentam mecanismos que viabilizam a síntese de vários compostos químicos durante a sua atividade metabólica e ciclo de vida (HOHMANN et al., 2016). Ainda neste processo, algumas classes de plantas sintetizam os metabólitos secundários, que são compostos químicos de uma mesma família, que possuem estruturas químicas homólogas. Nas plantas, estes metabólitos secundários podem, por exemplo, desempenhar funções protetoras contra microrganismos e insetos além de proteger a planta da radiação ultravioleta (HOHMANN et al., 2016).

Os terpenos são metabólitos secundários que nas plantas apresentam como uma das funções atuar como agentes de defesa em situações de estresse biótico e abiótico. Outra função importante que também é atribuída aos terpenoides está

relacionada com a síntese de moléculas sinalizadoras, que auxiliam na atração de insetos durante o processo de polinização (DE MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001). Alguns exemplos dessas moléculas são as fitoalexinas, que tem atividade contra fungos e bactérias e a (E)-4-8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, que tem atividade sinalizadora na atração química de insetos (SINGH; SHARMA, 2015).

Historicamente, existem registros que a sociedade humana utiliza derivados de produtos naturais desde o surgimento das primeiras civilizações organizadas. Nos últimos setenta anos, estes produtos tem ajudado a melhorar a qualidade de vida não só dos seres humanos, mas também dos animais em geral, fazendo com que a expectativa de vida de ambos praticamente dobrasse neste curto intervalo de tempo. Estes produtos, dentre os quais encontram os terpenos, revolucionaram a medicina e a indústria farmacêutica, auxiliando o homem em processos que abrangem desde o combate a infecções, reduções/extinções de processos inflamatórios e até mesmo no alívio da dor (WANG, G. et al., 2005). Citando ainda a revisão bibliográfica de Guimarães, Serafini e Quintans-Júnior de 2014, desde o ano de 1988 foram registradas em todo o mundo dezessete patentes reportando atividades analgésicas de alguns monoterpenos e sesquiterpenos (GUIMARÃES et al., 2014) de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Tabela de patentes de fármacos desenvolvidos com a utilização de monoterpenos e sesquiterpenos. Com adaptações (GUIMARÃES et al., 2014).

Terpeno	Inventor	Pais	Ano
α -pineno	London e Gibson	Estados Unidos	1988
Incarvillateína	Seiwa Phamaceutical	Japão	1998
Ácido mangiferônico (15 - 30%), β -elemeno (5 - 10%), α -guaiano (5 - 10%), aromadendreno (5 - 10%), hinesol (1-5%), ledol (1 - 5%), taraxerol (1 - 5%)	Nuñez Selles et al. Center pharmaceutical chemistry	Cuba	2000
Carvacrol, timol, 1,8-cineol, limoneno, pineno, 1,8-cineol	Papaprodromou	Canadá	2001
1,8-cineol, citral, limonene, linalool, acetate de metila, mentol, acetate de bornila, borneol, cânfora	Weise, General Cosmetics Corp.	Estados Unidos	2002
1,8-cineol, α - and β -pinene, limonene, α -terpineol, Terpene-4-ol, trans-b-farneseno	Weidner et al., Enrovita A/S Ferrosan A/S	Dinamarca	2003
Mentol, α - e β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, sabineno	Small R	Estados Unidos	2004
Farnesol, acetate de vetiveryl, mentol	Bothma et al.,Zelpy 2549 Ltd.	África do Sul	2007
Partenolide	Mitchell et al. GelStat Corp.	Estados Unidos	2007
Sweroside	Kwak et al., SK Chemicals Co.Ltd.	Coreia do Sul	2008
Linalol, mentona, borneol, nerol e neral, citronelol, geraniol, mirceno, p-cimeno, Limoneno, 1,8-cineol, cânfora	McLellan, Origin Biomed, Inc.	Canadá	2010
Citronelol (19,89%), geraniol (18,00%), β -felandreno (12,47%), linalol (10,23%), formiato de citronelilo (8,30%), Isomentona (7,53%)	McLellan et al.	Canadá	2011
Óleo essencial de gerânio	McLellan et al.	Canadá	2011
α -humulene, trans-cariofileno	Pianowski et al. Aché Pharmaceutical Laboratories S.A.	Brasil	2011
Huperzine A	Schachter President and Fellows of Harvard College	Estados Unidos	2011
Derivados sintéticos do geraniol	Reed et al. Neuroquest, INC	Canadá	2012
2-Metil-2-(4-metilpentano-3-en-1-il)ciclopropil) metanol	McLellan et al.Neuroquest, INC	Canadá	2013

Recentemente, alguns estudos relataram componentes solubilizados oriundos de resinas vegetais, em particular os terpenos, para aplicações anti-inflamatórias e antitumorais (ALEXANDRE SCHEFER et al., 2017; FORMISANO et al., 2017; GAO et al., 2017; MOHAMED et al., 2016; RODRIGUEZ-CHAVEZ et al., 2017; ROMERO-ESTRADA et al., 2016; WANG, Y. et al., 2017; XING et al., 2017). Como outras atividades farmacológicas também são atribuídas aos terpenos, alguns já são utilizados com propósitos biomédicos e biotecnológicos. Na tabela 3 estão descritos alguns exemplos de terpenos que foram objetos de estudo para avaliação da sua potencial atividade. Em muitos desses efeitos, a interação primária dos terpenos ocorre com as membranas biológicas presentes nas células.

Tabela 3. Outras atividades farmacológicas de alguns terpenos.

Terpeno	Atividade estudada	Referência
D-limoneno	Prevenção de câncer de mama e fígado.	(YOON; LEE; HYUN, 2010)
1,8-cineol	Analgésico e anti-inflamatório.	(TAKAISHI et al., 2012)
Ácido boswellico	Anti-inflamatório.	(ANTHONI et al., 2006)
Ácido betúlico	Antiviral e anticâncer.	(ALAKURTTI et al., 2006 ; HSU et al., 2012)
β -sitosterol	Prevenção de câncer na próstata, auxílio no tratamento de tuberculose.	(BERGES; KASSEN; SENGE, 2000; DE CASSIA DA SILVEIRA E AS; ANDRADE; DE SOUSA, 2013; WILT; MACDONALD; ISHANI, 1999)
Ácido ursólico	Prevenção de câncer na próstata e anti-inflamatório.	(SHANMUGAM et al., 2012)
β -Cariofileno	Antimalárica, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiana.	(DAHAM et al., 2015 ; DE SOUZA et al., 2017 ; KELANY ; ABDALLAH, 2016 ; OJHA et al., 2016 ; SANTOS et al., 2017 ; VARGA et al., 2017)

Uma busca mais recente no banco de patentes PATENTSCOPE (WIPO), identificou que especificamente para o cariofileno desde 2014 foram registradas mais quatro patentes que utilizam na sua formulação este terpeno (Tabela 4).

Tabela 4. Registros de patentes com a utilização do Cariofileno desde o ano de 2014.

Terpeno	Atividade farmacológica	Inventor	País	Ano
β -Cariofileno	Anti-inflamatório	Mary Lynch	Canada / USA	2015
β -Cariofileno	Processo de cicatrização de ossos.	Primus Pharmaceuticals, Inc.	USA	2017
β -Cariofileno, catequinas, baicalin	Anti-inflamatório	Primus Pharmaceuticals, Inc.	USA	2017
β -Cariofileno, humuleno	Tratamento de esquizofrenia	Ariel Scientific Innovations LTD	USA	2017

1.6 - Características moleculares do β -cariofileno

A molécula do sesquiterpeno β -cariofileno é constituída somente por átomos de carbono e hidrogênio, possui a fórmula $C_{15}H_{24}$ e massa molecular monoisotópica de 204,19 Da. A Figura 7-A representa a molécula no plano horizontal e a Figura 7-B a mesma molécula no plano horizontal com os átomos de carbono numerados.

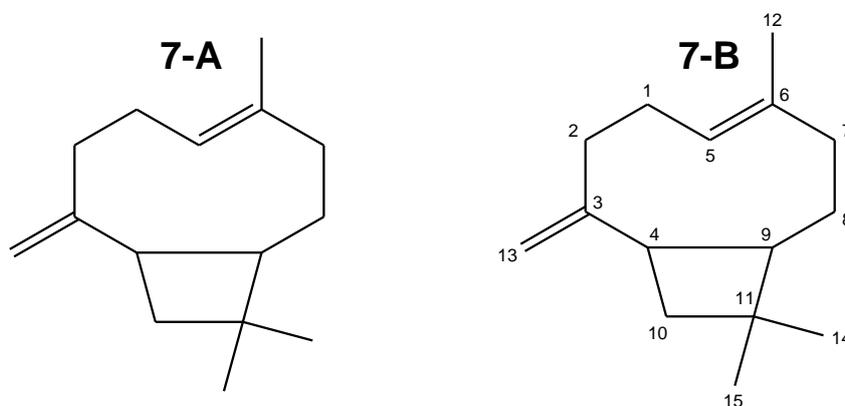


Figura 7-A: Representação da molécula de β -cariofileno no plano horizontal. **7-B:** Representação no plano horizontal com os átomos de carbono numerados.

As Figuras 8-A-D representam a molécula em um arranjo 3D com todos os átomos de carbono e hidrogênio identificados e rotações de 0° , 90° , 180° e 360° tendo como referência o eixo longitudinal do anel formado pelos C4, C9, C11 e C10. Este modo de ilustração foi elaborado para demonstrar que a molécula praticamente não apresenta um momento dipolo definido devido à distribuição espacial dos átomos de C e H e pela ausência de heteroátomos, característica que justifica o caráter apolar desta molécula e evidencia a sua insolubilidade em meio aquoso.

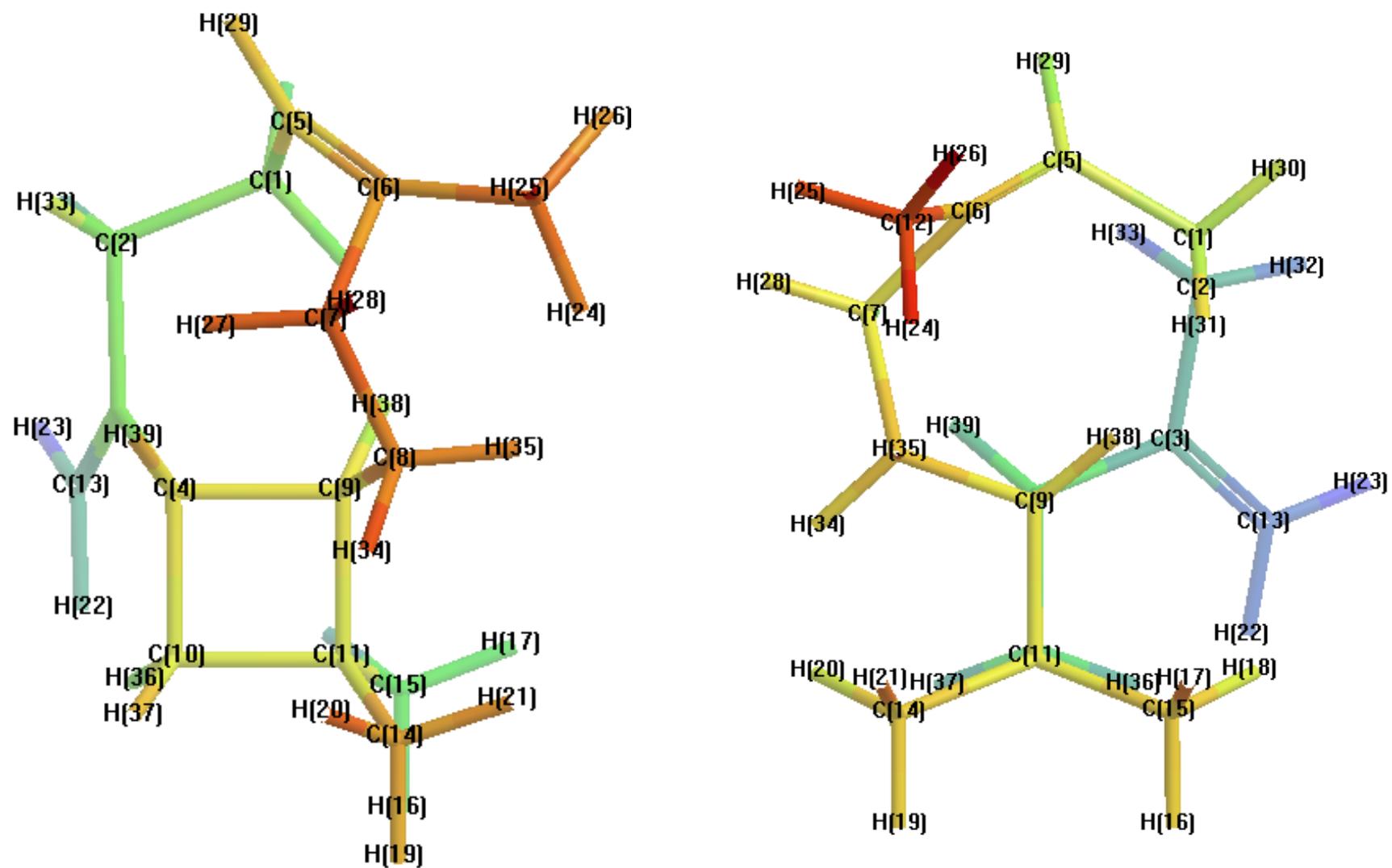


Figura 8-A: Molécula de β -cariofileno em 3D. Rotação: 0°. Referência C4, C9, C11 e C10. 8-B: Rotação: 90°. Referência C9 e C11.

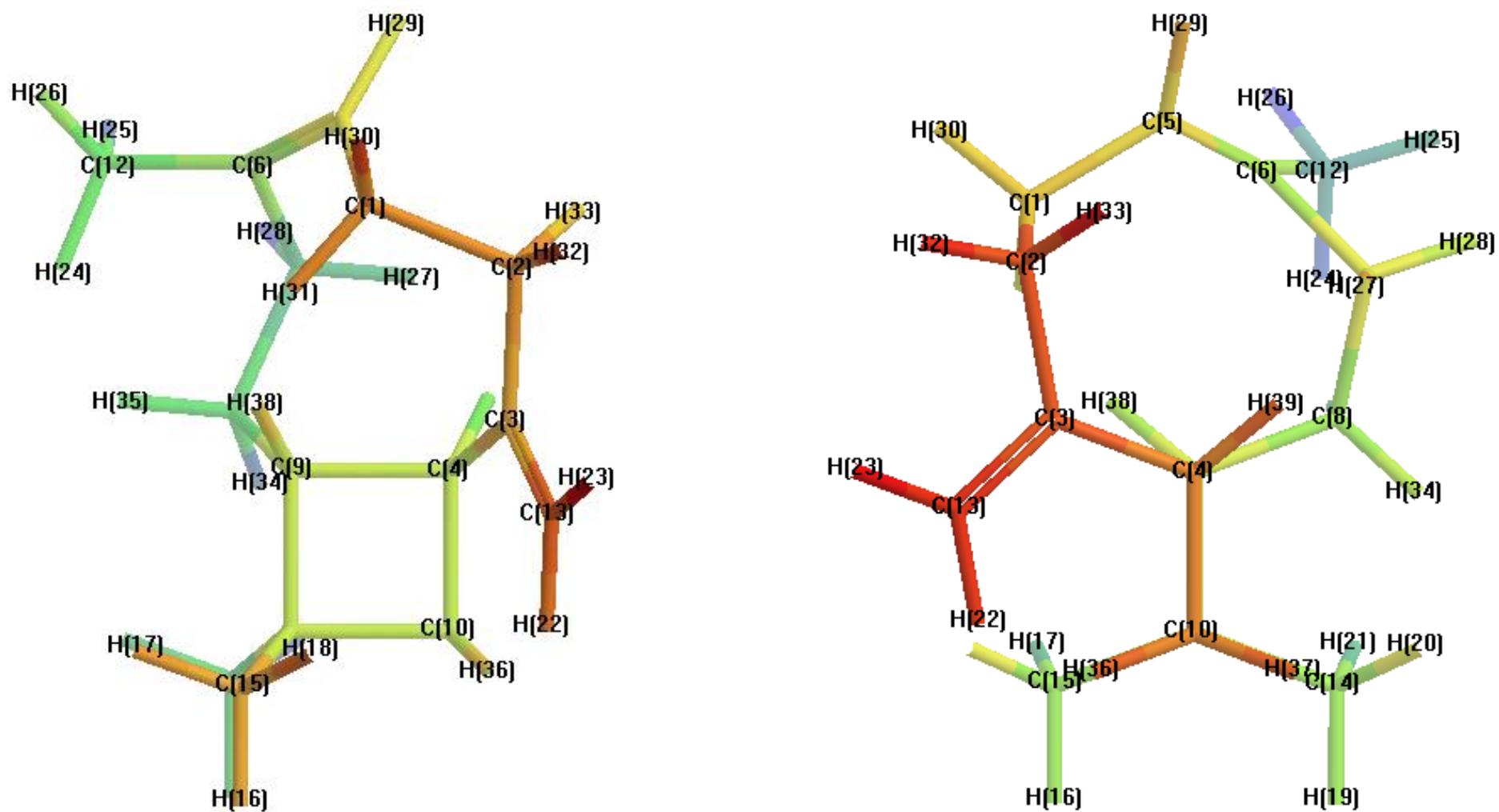


Figura 8-C: Rotação: 180°. Referência C9, C4, C10 e C11. 8-D: Rotação: 360°. Referência C4 e C10.

1.7 - Características biológicas da molécula de β -cariofileno

A descoberta de que a molécula de β -cariofileno tem ação farmacológica no sistema imunológico periférico de receptores endocanabinoides (CB2) como agente agonista, motivou o desenvolvimento de estudos mais aprofundados sobre o mecanismo biológico de atuação desta molécula no sistema imune dos mamíferos (GERTSCH, 2008; GERTSCH et al., 2008; PAULA-FREIRE et al., 2014). Como visto na seção 1.6, o β -cariofileno não possui outros grupos funcionais na sua estrutura além de ligações simples C-H, C-C e ligações duplas C-C. Estas características conferem ao β -cariofileno uma natureza de compostos olefínicos.

Esta característica intrínseca acaba por distinguir o β -cariofileno de outras moléculas de natureza lipofílica que possuem atividade já reconhecida com os receptores do tipo CB2. Geralmente moléculas que atuam neste sistema possuem como característica regiões polarizadas localizadas em grupos funcionais derivados de amidas, ésteres, álcoois e fenólicos (APPENDINO; CHIANESE; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2011; YANG; WANG; XIE, 2012).

Em um estudo desenvolvido por Gertsch et al em (2008), duas moléculas homólogas derivadas do β -cariofileno, o óxido de β -cariofileno e o humuleno ou α -humuleno (Figuras 9-A e 9-B, respectivamente), também tiveram a sua atividade avaliada na interação com mecanismos CB1 (Sistema de receptores endocanabinoides localizados nos terminais nervosos pré-sinápticos) e CB2. No entanto as mesmas não apresentaram atividade nos mecanismos avaliados (GERTSCH et al., 2008).

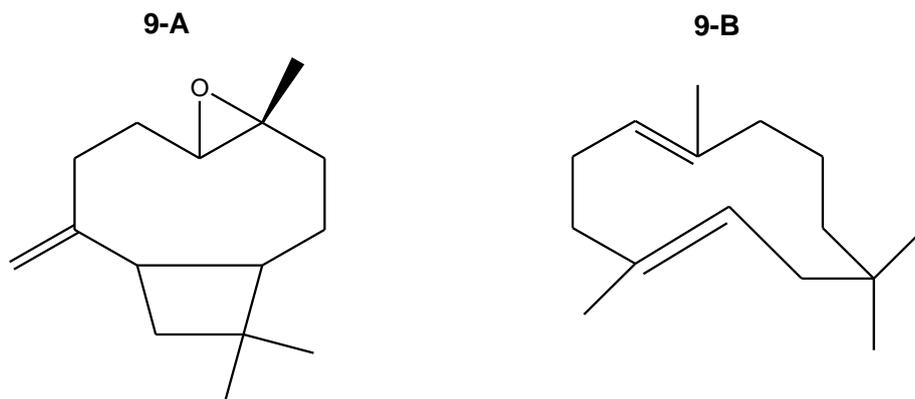


Figura 9-A: Representação da molécula do óxido de β -cariofileno. **9-B:** Representação da molécula do humuleno.

Comparando as estruturas 7-A, 9-A e 9-B, Chicca et al 2014, atribuem a atividade nos mecanismos CB1 e CB2 do β -cariofileno a conformação espacial desta molécula devido a dupla ligação endocíclica entre os carbonos C5 e C6 (Figura 7-B e Figura 10) e os possíveis rearranjos conformacionais da metila do carbono C12 que podem ocorrer internamente no anel principal de 9 carbonos do β -cariofileno (Figura 10) (CHICCA et al., 2014).

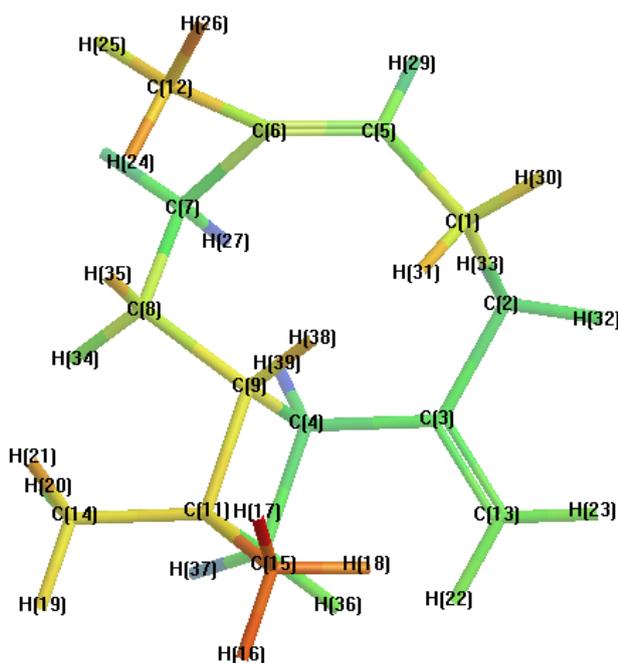


Figura 10. Representação da molécula do β -cariofileno da perspectiva dos carbonos C6, C5 e C12. Destacando a dupla ligação entre os carbonos C6 e C5 e possibilidade de rearranjo do carbono C12 com os outros carbonos do anel principal de nove carbonos.

Ainda tratando da abordagem realizada no trabalho desenvolvido por Chicca et al em 2014, foram avaliadas quais os potenciais mecanismos de ação de moléculas funcionalizadas do β -cariofileno em CB1 e CB2. Um dos derivados funcionalizados foi o cariolanol, que é um álcool do β -cariofileno. Esta molécula tem fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ e a massa molecular monoisotópica de 222,2 Da. A sua estrutura planar e em 3D é representa pelas Figuras 11-A e 11-B, respectivamente. Pelo menos parte dos mecanismos de ação de moléculas derivadas de β -cariofileno parecem estar relacionados com interações com membranas celulares (SARPIETRO et al., 2015).

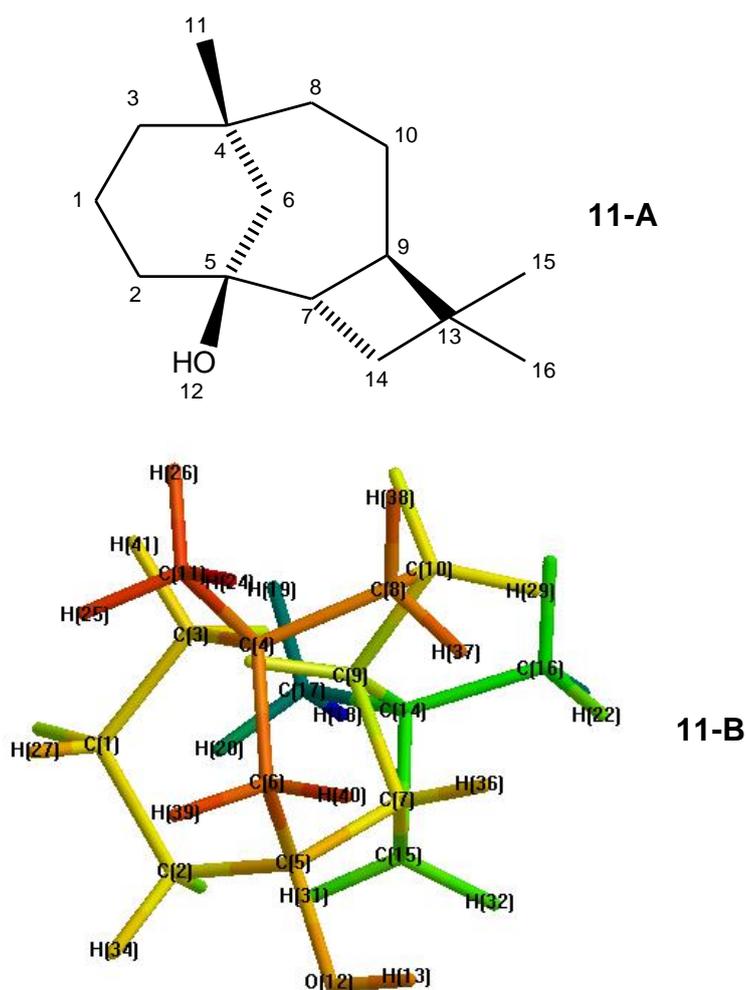


Figura 11-A: Representação planar da molécula do cariolanol. **11-B:** Representação em 3D dimensões da molécula do cariolanol. Referência carbono C1.

1.8 - Membranas biológicas

Membranas biológicas exercem um papel fundamental na manutenção da estrutura compartimentalizada das células procarióticas e eucarióticas. Estas estruturas são responsáveis pela delimitação física entre o citoplasma e o meio extracelular, assim como pela compartimentalização interna das organelas no caso das células eucarióticas (PHILLIPS et al., 2009). Outras funções importantes desempenhadas pelas membranas celulares estão relacionadas com mecanismos sensoriais e de sinalização. Também atuam como barreiras seletivas ao fluxo de moléculas para o meio intracelular e extracelular, além do transporte e produção de energia nas organelas (PHILLIPS et al., 2009).

Os lipídeos, em conjunto com as proteínas, são os principais constituintes das membranas biológicas e o sinergismo entre estes dois componentes é responsável pelo principal mecanismo de transporte das células, via formação de vesículas (HURLEY et al., 2010).

Nas membranas biológicas, de uma maneira geral, ocorrem até cinco classes de lipídeos, sendo eles: os glicerofosfolipídeos, os galactolipídeos, sulfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis (VAN MEER; DE KROON, 2011).

Os glicerofosfolipídeos são os componentes lipídicos majoritários encontrados nas membranas biológicas. Quando um grupo fosfato está esterificado ao glicerol nos glicerofosfolipídeos, estes lipídeos recebem a denominação de fosfolipídeos. Nesse sentido, os fosfolipídeos denominados fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e cardiolipina são os principais lipídeos encontrados em membranas de organismos eucariotos e procariotos (VAN MEER; DE KROON, 2011; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

Os fosfolípidos apresentam como característica comum uma extremidade hidrofílica (polar) e uma extremidade hidrofóbica (apolar) (Figura 12). Esta característica intrínseca dos fosfolípidos atribui a essas moléculas características anfifílicas, diferentemente de outros lípidos. Assim, em meio aquoso, isto resulta na possibilidade de formação de aglomerados e agregados de lípidos que por um processo cooperativo formam micelas unilamelares, onde a porção hidrofílica mantém o contato com o meio aquoso (externo) e a porção hidrofóbica volta-se para o interior da micela.

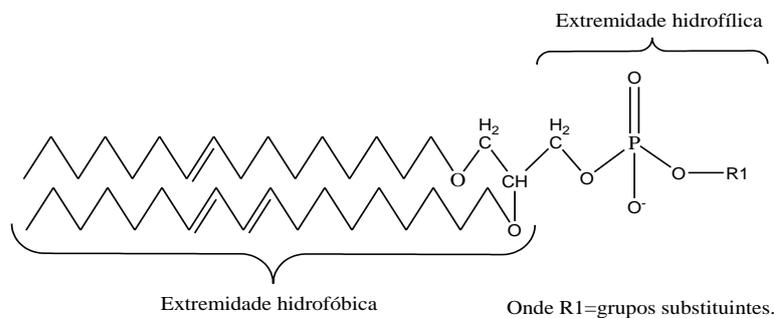


Figura 12. Exemplo da estrutura geral de um fosfolípido.

Os glicerofosfolípidos apresentam duas cadeias hidrocarbonadas na região apolar da sua estrutura, sendo que as micelas formadas por estes lípidos apresentam uma característica peculiar, que a formação de micelas com duas ou mais camadas (multilamelares). Nesse arranjo, o núcleo interior destas vesículas tem compatibilidade com substâncias polares (Figura 13).

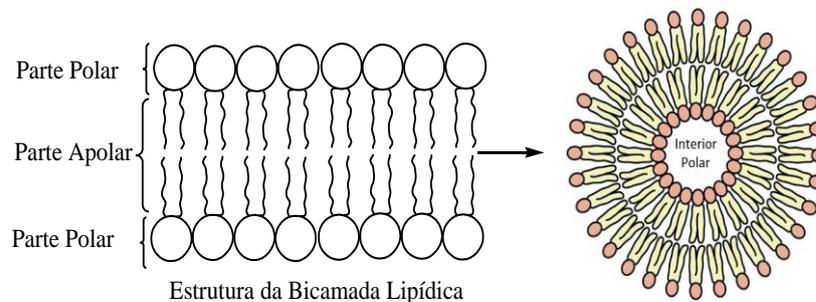


Figura 13. Exemplo de formação de estruturas micelares com bicamada lipídica. Adaptado de (WATSON, 2015)

Vesículas biomiméticas com estruturas multilamelares também são comumente conhecidas como lipossomas e desde a sua primeira observação em 1964 por Bangham e Horne, a utilização destas estruturas se popularizou no meio acadêmico, farmacêutico e de cosméticos (DEAMER, 2010). De uma maneira geral, os lipossomas são biocompatíveis, facilmente internalizados pelas células e tem uma rápida difusão na corrente sanguínea. Outra característica importante apresentada pelos lipossomas é a possibilidade da sua estrutura polar também atuar como superfície protetora, preservando as substâncias que podem ser armazenadas no interior (TORCHILIN, 2005).

Devido a esta característica anfifílica, os lipossomas são capazes de armazenar e transportar até mesmo simultaneamente tanto substâncias solúveis em meio aquoso no seu compartimento polar, quanto substâncias insolúveis intrincadas na bicamada apolar da membrana. Assim, atualmente os lipossomas são utilizados eficientemente na veiculação de inúmeros antibióticos e outras drogas (DAVIS, 2004; LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; TORCHILIN, 2005;2014).

Os lipossomas também estão sendo recentemente estudados para veiculação de moléculas da classe dos terpenos, inclusive o β -cariofileno, que são insolúveis em meio aquoso e apresentam potencial atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e nutracêuticos (PENG et al., 2017; SARPIETRO et al., 2015; TAN et al., 2016). Por esse motivo, o processo de interação entre terpenos e lipossomas precisa ser investigado.

2. JUSTIFICATIVA

Sesquiterpenos como aqueles encontrados em resinas vegetais na forma de copais são moléculas que apresentam potencial biotecnológico e farmacológico como anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos relatados na literatura, dentre outras atividades que são identificadas em novos trabalhos. No Brasil, árvores como o jatobá (*H. courbaril*) constituem uma fonte natural abundante nestes terpenos na forma de copais. Caracterizações moleculares realizadas anteriormente (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009; KHOO et al., 1973; MARTIN et al., 1972) de copais de árvores do gênero *Hymenaea* identificaram que o cariofileno, uma molécula da família dos sesquiterpenoides, é o componente majoritário.

No entanto, esta classe de moléculas não apresenta boa solubilidade em meio aquoso, o que pode afetar a sua biodisponibilidade e o seu potencial terapêutico. Assim, a formulação de miméticos de membranas biológicas como lipossomas constitui um importante sistema para veiculação desta classe de moléculas que apresenta baixa solubilidade. Além disso, a utilização de lipossomas também possibilita avaliar de uma maneira fidedigna quais as melhores condições de estudo em quesitos como: concentração de ativos, potencial de ação farmacológica, mecanismos de interação, transporte e difusão.

Os métodos calorimétricos de análise em conjunto com microscopias, cromatografias, espectrometrias de massa e espectroscopias são importantes ferramentas que auxiliam na avaliação da identidade estrutural e química, assim como na avaliação da hipótese da efetividade real dos processos de interação e transporte de substâncias utilizando lipossomas. Por esse motivo, estratégias envolvendo tais técnicas constituem foco de interesse científico e tecnológico deste presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Caracterizar morfologicamente, ultra estruturalmente, quimicamente, molecularmente e avaliar as possíveis modificações químicas e estruturais resultantes da interação das moléculas presentes no solubilizado do copal de jatobá em lipossomas.

3.2 - Objetivos específicos:

a) Caracterizar o perfil fitoquímico e ambiente químico do copal de *Hymenaea courbaril* (jatobá) por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e espectroscopia Raman;

b) Caracterizar a estrutura do copal de jatobá em alta resolução por meio de microscopia de força atômica e microscopias eletrônicas de varredura e transmissão;

c) Formular lipossomas de DMPC por extrusão e avaliar os possíveis efeitos de solubilizado do copal de jatobá e do cariolanol nessas vesículas por meio de espalhamento de luz dinâmico, calorimetria exploratória diferencial e calorimetria de titulação isotérmica.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 - Fundamentação teórica e princípios das técnicas empregadas

4.1.1 - Microscopias Eletrônicas e Microscopia de Força Atômica

No contexto das análises topográficas e ultra-estruturais, a utilização das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (MFA) são importantes ferramentas que auxiliam na elucidação das estruturas estudadas, inclusive algumas amostras de âmbar já foram analisadas por estas técnicas (BARLETTA; WANDEL, 2011; GOLUBEV; KOVALEVA, 2012; LAŠENKO INGA; GAIDUKOV; ROMBOVSKA, 2016).

O MEV, é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos devido a sua grande profundidade de campo, o que possibilita a aquisição de imagens em três dimensões de grande qualidade.

No processo de formação de imagens no MEV, a interação dos elétrons secundários (ES) e os retroespalhados (ER) com a superfície metalizada da amostra, são os principais sinais detectados na formação das imagens. Os sinais dos ES são utilizados na composição das imagens topográficas de superfície e na formação das imagens de alta resolução. Já os ER são utilizados na formação de imagens que indicam a variação de composição da amostra (REICHEL, 2007).

O poder de magnificação destes instrumentos pode chegar a 350.000x, sendo a sua escala de observação bem ampla, possibilitando análises entre as faixas de grandeza da ordem dos milímetros (mm) até nanômetros (nm).

O MET é um instrumento que possibilita estudar a ultra-estrutura interna dos materiais analisados na escala nanométrica e sub-atômica. A ordem de

magnificação desta classe de instrumentos varia de 400.000x para os instrumentos mais simples, podendo chegar até a 1.500.000x para os microscópios de transmissão de alta-resolução (GRUEHN, 1989; WILLIAMS; CARTER, 1996).

Para a formação das imagens no MET, os elétrons utilizados são os que atravessam a amostra e a formação do contraste das imagens decorre da mudança na amplitude e na fase das ondas eletromagnéticas durante a interação do feixe de elétrons com a amostra.

No entanto, apesar do MET possibilitar aquisição de imagens em alta-resolução de alta qualidade, o processo de preparação de amostras é muito elaborado, sendo necessário para este tipo de análise o seccionamento das amostras em ultra-micrótomos. A Figura 14 exhibe um comparativo esquemático dos principais componentes de um MEV e MET.

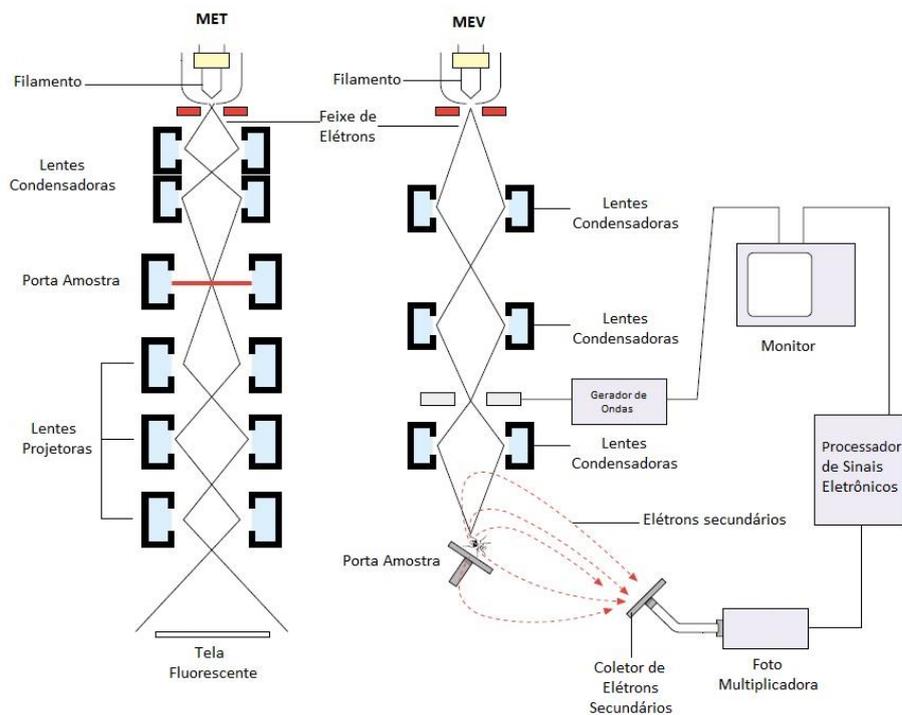


Figura 14. Representação esquemática dos principais componentes de um MEV e MET. Com adaptações (BOZZOLA, 2001).

Neste contexto, a utilização do MFA possibilita a análise e aquisição de imagens em alta-resolução à nível de resolução atômica. As áreas de aplicação onde o AFM pode ser utilizado são várias, abrangendo componentes eletrônicos, polímeros, biomateriais e amostras biológicas sem a necessidade de tratamento e etapas de preparação de amostras muito elaboradas (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004).

O MFA apresenta três modos possíveis de análise: Modo Contato, Não-contato e Contato Intermitente. A depender das características da amostra, alguns tipos de análise são mais adequados. Especificamente no caso da amostra do copal do Jatobá, como o interesse principal foi de avaliar a superfície do material, para averiguação da nano-estrutura foi utilizado o modo contato. A Figura 15 representa o esquema básico dos principais componentes de um MFA.

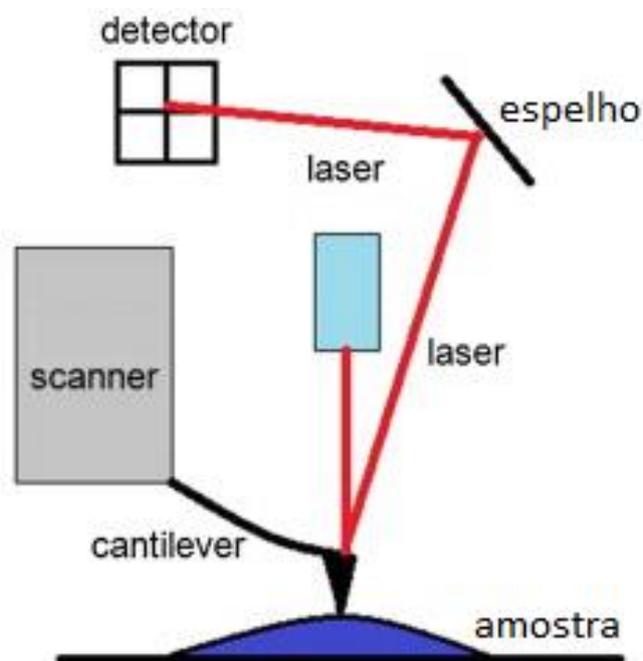


Figura 15. Representação esquemática dos principais componentes de um MFA. Com adaptações (CHANG et al., 2012).

4.1.2 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-MS)

A utilização do CG-MS para identificação de compostos voláteis e não voláteis tem se mostrado uma importante abordagem em análises qualitativas e quantitativas que envolvem o estudo de componentes incompatíveis com meios aquosos como é o caso das substâncias presentes em copais e âmbar. De fato, esta é atualmente uma das principais técnicas utilizadas na identificação de produtos naturais derivados de plantas. Devido ao elevado poder de separação que as colunas capilares proporcionam e à alta sensibilidade dos detectores de massa, geralmente é possível se obter um grau de resolução satisfatório mesmo para amostras com elevado grau de complexidade, como é o caso das amostras provenientes da maioria dos extratos de plantas (MITIĆ et al., 2017). A figura 16 representa um desenho esquemático dos principais componentes de um CG-MS.

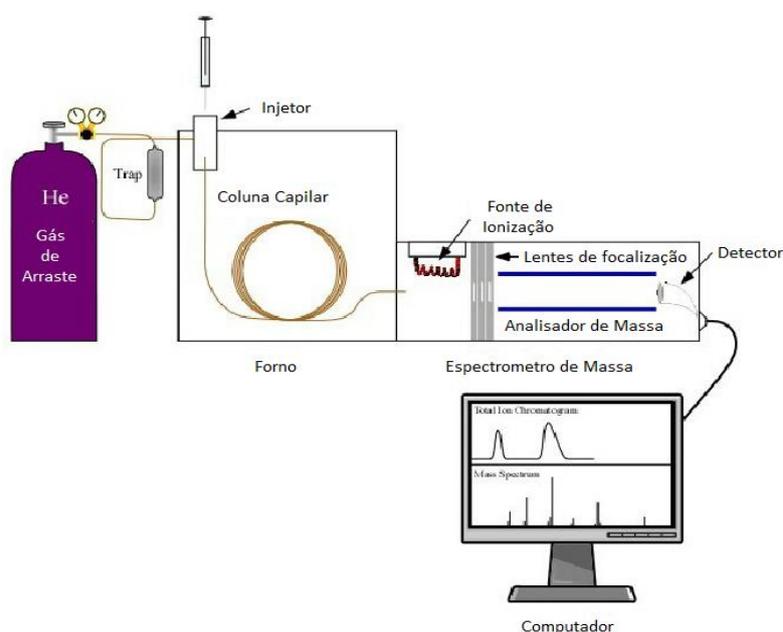


Figura 16. Desenho esquemático dos principais componentes de um CG-MS.

4.1.3 - Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica baseada na detecção das energias vibracionais envolvidas nas ligações entre os elementos químicos e a interação entre moléculas. O princípio físico desta técnica é baseado no espalhamento inelástico de um feixe de luz monocromática (laser) de baixa potência quando este incide sobre a superfície de uma amostra (SCHLUCKER, 2014). Assim, a diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia vibracional dos átomos que estão na área de irradiação do laser. Mediante estes dados, é possível obter informações sobre estrutura e a composição química das amostras avaliadas (SCHLUCKER, 2014).

A espectroscopia Raman é classificada como uma técnica não destrutiva e que praticamente não exige etapas muito elaboradas de preparação de amostra. Além disso, esta técnica apresenta a vantagem de ser versátil, visto que é possível analisar amostras nos três estados físicos da matéria: sólido, líquido e gasoso (CHRIMES et al., 2013). Por ser uma técnica capaz de detectar níveis energéticos de excitação mínimos, o efeito Raman é utilizado principalmente na caracterização dos espectros das “impressões digitais” das moléculas e substâncias estudadas (CHRIMES et al., 2013). A Figura 17 ilustra os principais componentes de um microscópio Raman.

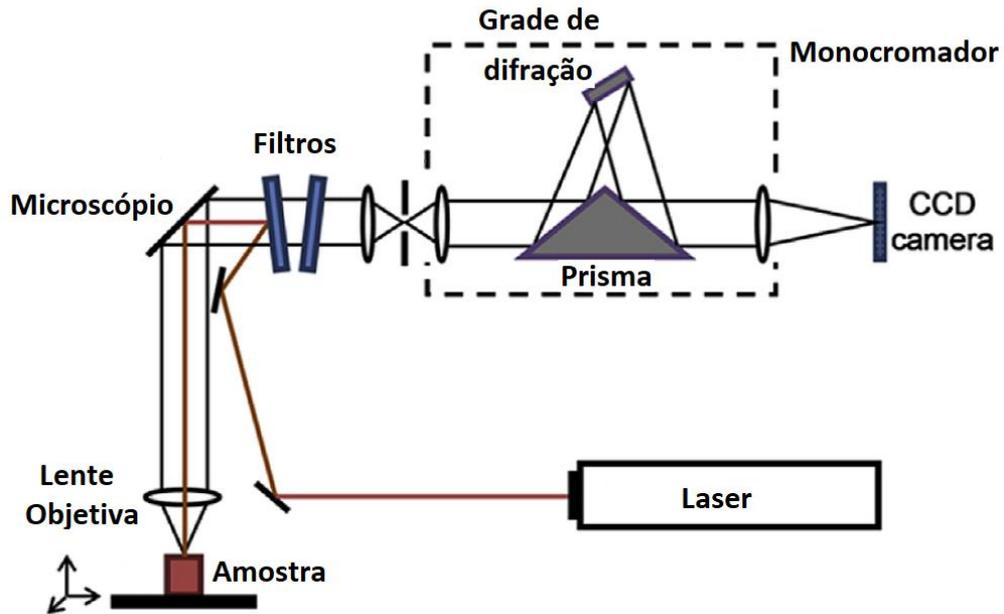


Figura 17. Desenho esquemático dos principais componentes de um microscópio Raman. Com adaptações (LI; CHURCH, 2014).

4.1.4 - Espalhamento de luz dinâmico - *Dynamic Light Scattering (DLS)*

A fundamentação teórica da técnica de espalhamento de luz dinâmico baseia-se na movimentação das partículas em um meio fluido. A movimentação e as colisões das partículas entre si e as moléculas do solvente é um fenômeno aleatório que foi primeiramente observado com a utilização da microscopia de luz pelo cientista Robert Brown no ano de 1827. Desde então, em sua homenagem este fenômeno é conhecido como Movimento Browniano (MB). Em 1905 o cientista Albert Einstein explicou fisicamente o fenômeno, atribuindo o movimento das partículas às colisões com as moléculas do solvente que estão em constante movimento devido à fluidez do meio. De acordo com a teoria do MB, quanto maior for a massa da partícula suspensa em meio líquido, menor será a sua velocidade de deslocamento. Já as partículas menores, deslocam-se com uma velocidade maior após os choques com as moléculas do solvente devido a sua menor massa molecular (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Além da massa molecular das partículas, a temperatura

e a viscosidade do meio influenciam a velocidade de deslocamento das partículas. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade do MB. Quanto maior a viscosidade, menor a velocidade do MB (STETEFELD et al., 2016).

O DLS é uma técnica não destrutiva que possibilita medir o tamanho e a distribuição de tamanhos das partículas na faixa dos micrometros e nanômetros de acordo com o MB e o espalhamento da luz em suspensões diluídas. Durante a análise no DLS, a suspensão de partículas é irradiada por um feixe de luz monocromática. Parte da luz espalhada pelas partículas é digitalizada pelo correlator, que compara a intensidade da luz espalhada em função do tempo. A Figura 18 representa um desenho esquemático de um equipamento de DLS.

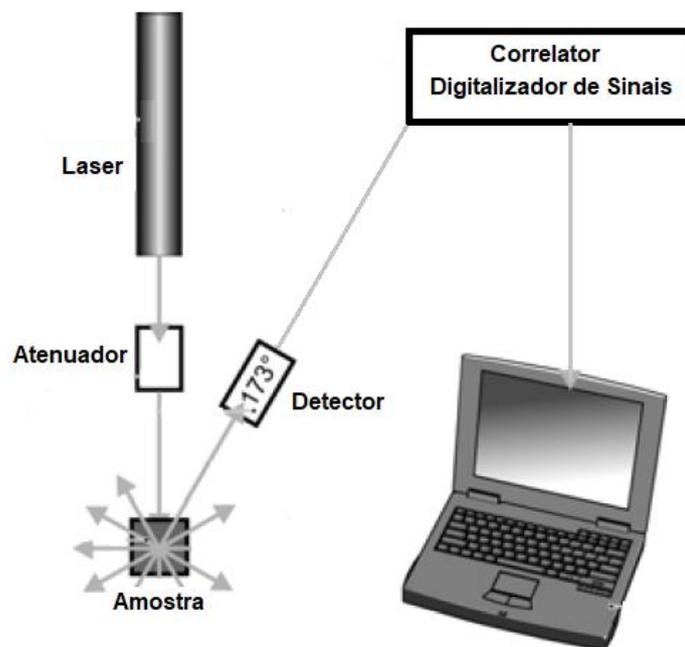


Figura 18. Desenho esquemático de um equipamento de DLS. Com adaptações Horiba Instruments.

O diâmetro hidrodinâmico - $d(H)$, das partículas é um dos principais parâmetros que podem ser medidos com a utilização dos instrumentos de DLS. Estes dados são obtidos calculando-se o coeficiente translacional de difusão da partícula via relação Stokes-Einstein (Equação 1).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi nD} \quad \text{Equação 1}$$

Os termos da equação são definidos como:

$d(H)$ = *diâmetro hidrodinâmico*

K = *constante de Boltzmann*

T = *Temperatura*

n = *Viscosidade*

D = *Coeficiente Translacional de Difusão*

Via algoritmos e relações matemáticas é possível ainda obter pelas análises de DLS informações relacionadas com o diâmetro por intensidade, diâmetro por volume, diâmetro por número e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas.

4.1.5 - Calorimetria exploratória diferencial - *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

A DSC é uma técnica termoanalítica utilizada para o monitoramento das variações de entalpia (diferenças de energia) de uma amostra em relação a um material de referência quando as mesmas são submetidas a uma variação de temperatura controlada em células de análise (FREIRE, ERNESTO, 1995).

O calorímetro possui duas células de leitura individualizadas, sendo que uma célula contém um material de referência e a outra célula contém a amostra. Na configuração experimental da maioria dos equipamentos de DSC, ambas as células estão envoltas em uma cápsula com isolamento térmico, de modo a não permitir que variações de temperatura no ambiente externo e no instrumento afetem as medições experimentais. Durante a análise à pressão constante, ambas as células são submetidas a uma mesma taxa de aquecimento ou resfriamento e então o instrumento monitora o fluxo de calor absorvido ou liberado pela amostra e registra essa informação como um termograma. Na Figura 19 consta um desenho esquemático exemplificando os principais componentes de uma célula calorimétrica.

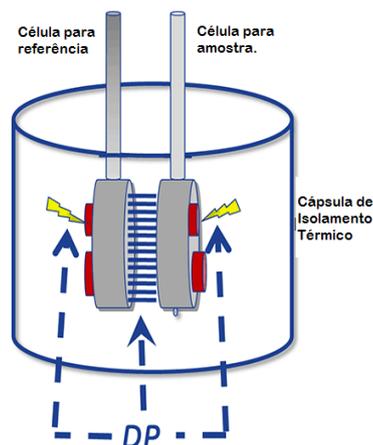


Figura 19. Desenho esquemático de uma célula calorimétrica, onde uma diferença de potencial (DP) é aplicada durante o aquecimento das células. Adaptado de Malvern Instruments.

A Figura 20 exemplifica um termograma, que também é conhecido como endoterma ou exoterma a depender do tipo de reação que está sendo monitorado, com as principais informações que podem ser obtidas durante a análise de uma substância, onde se aplicou calor para monitorar o comportamento da mesma em um evento termicamente induzido.

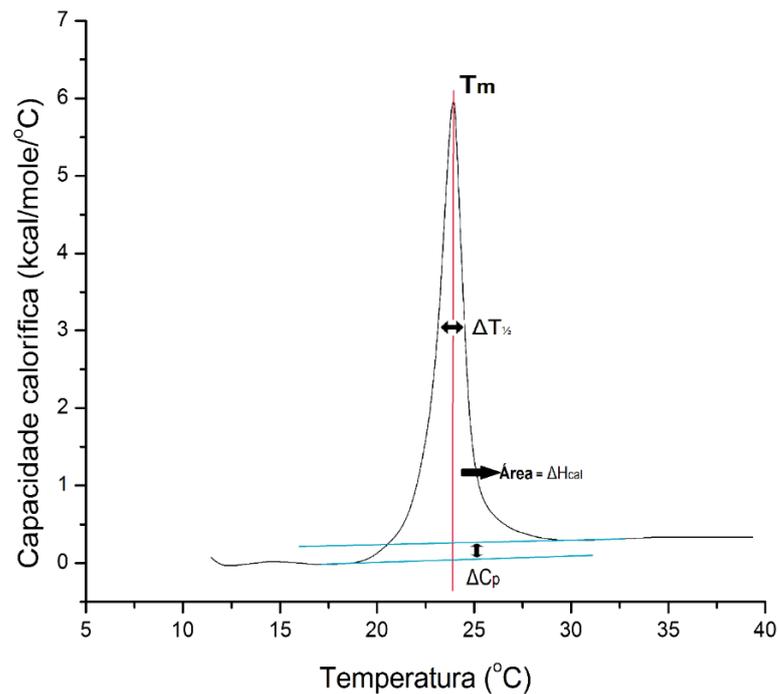


Figura 20. Exemplo de um termograma e as principais informações fornecidas durante um evento termicamente induzido de uma substância.

A área total sob a curva representa a entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e este parâmetro possibilita calcular o comportamento termodinâmico que caracteriza cada substância analisada. O T_m é a temperatura de transição de fase (do termo em inglês “*melting transition*” (T_m)), e representa o momento em que a maioria das moléculas atinge a capacidade calorífica máxima, sendo que geralmente há uma alguma alteração organizacional neste momento e no caso dos fosfolipídeos de membranas (modelo do presente estudo) é a transição da fase gel para a fase líquido-cristalina (ALBON; STURTEVANT, 1978; FIDORRA; HEIMBURG; SEEGER,

2009). Como durante a análise a pressão é mantida constante, a variação da energia livre de Gibbs é nula na temperatura de transição. Assim é possível calcular a entropia associada a estas transições pela equação (2.1):

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m} \quad (2.1)$$

Conforme pode ser observado na Figura 20, O ΔC_p representa a capacidade calorífica à pressão constante. O $\Delta T_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura durante todo o processo de transição, no caso de fosfolipídeos representa o grau de cooperatividade de todo o processo (MARSH; WATTS; KNOWLES, 1977). A entalpia de van'tHoff (ΔH_{VH}) é obtida a partir da relação entre o T_m e $\Delta T_{1/2}$ (MARSH et al., 1977) e é diretamente obtida pela análise do termograma após os cálculos da área e ajustes das curvas.

A partir da relação entre as entalpias calorimétricas e a de van'tHoff, é possível obter o valor da unidade cooperativa (**n**), que é uma maneira indireta de se calcular aproximadamente a cooperação intermolecular entre os fosfolipídeos de membrana (MARSH et al., 1977), dada pela equação (2.2).

$$n = \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}} \alpha \frac{1}{\Delta T_{1/2}} \quad (2.2)$$

Pelo valor de **n** é possível estimar o número médio de um conjunto de aglomerados de fosfolipídeos que participam da transição de fase no formato de uma unidade cooperativa (FREIRE, E.; BILTONEN, 1978; GRABITZ; IVANOVA; HEIMBURG, 2002; KANEHISA; TSONG, 1978; VAN OSDOL et al., 1991).

4.1.6 - Calorimetria de titulação isotérmica - *Isothermal Titration Calorimetry (ITC)*

Diferentemente da DSC a qual mede a diferença de temperatura entre uma amostra e a referência, a ITC possibilita medir a troca de calor durante o processo de interação de duas espécies químicas de modo gradual e contínuo em uma célula calorimétrica à temperatura constante possibilitando complementar as avaliações calorimétricas de uma amostra em estudo (FREIRE, ERNESTO; MAYORGA; STRAUME, 1990; VELÁZQUEZ-CAMPOY et al., 2001). Dessa forma, o titulante é adicionado continuamente em agitação contínua por meio de uma seringa em uma célula contendo o titulado. Na Figura 21 consta um desenho esquemático exemplificando os principais componentes de uma célula calorimétrica de ITC.

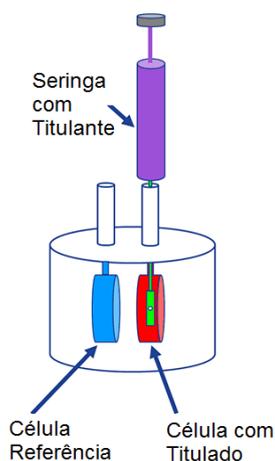


Figura 21. Desenho esquemático de uma célula calorimétrica de ITC. Adaptado de Malvern Instruments.

O ITC mede a energia global do sistema, ou seja, a energia de interação entre as espécies químicas do titulante e titulado; energia de solvatação e diluição; rearranjos moleculares; alterações conformacionais; e a energia resultante da agitação para homogeneização do sistema (BRUYLANTS; WOUTERS; MICHAUX, 2005; JELESAROV; BOSSHARD, 1999; SALIM; FEIG, 2009).

4.2 - Material

4.2.1 - Reagentes: Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich), etanol grau HPLC (Merck), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC) (Avanti Polar Lipids Inc), padrão de β -cariofileno (Sigma-Aldrich), clorofórmio grau GC-MS (Charlau Industrias químicas), ácido sulfúrico (Merck), ácido fosfomolibdênico (Sigma-Aldrich), éter dietílico (Charlau Industrias químicas), éter de petróleo (Charlau Industrias químicas), acetonitrila (JT. Baker), acetato de etila (Merk), diclorometano (Sigma-Aldrich), hexano (Sigma-Aldrich), acetona (Sigma-Aldrich), tampão fosfato salina (PBS) (Sigma-Aldrich), solução aquosa saturada de cloreto de sódio (Merck), tiocianato de amônio (Sigma-Aldrich), cloreto de ferro III (Sigma-Aldrich), água tipo I - Milli-Q (Millipore), detergente contrad 70 (DeconLabs), acetato de uranila 5% (Polysciences Inc.), tela de cobre 200 Mesh coberta com formvar (Pelco), sílica gel 60, 0,06 – 0,2 mm, 70-230 mesh (Charlau Indústrias químicas), nitrogênio gasoso (White Martins).

4.2.2 - Equipamentos: Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa GC-MS modelo QP2010 (Shimadzu), espectrometro de massa micrOTOF II (Bruker Daltonics) com modo de ionização electrospray, microcalorímetro VP-DSC (Malvern), microcalorímetro VP-ITC (Malvern), MicroCal ThermoVac (Malvern), analisador de tamanho de partículas e potencial Zeta de superfície ZetaSizer modelo Nano ZS (Malvern), microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu), microscópio eletrônico de varredura JSM-7001F (Jeol), evaporador MED 020 Coating System (Bal-tec), microscópio eletrônico de transmissão EM 109 (Zeiss), ultramicrótomo Leica UCT (Leica), microscópio confocal Raman Alpha 300 RA (Witec), balança analítica AUW 220D (Shimadzu), rotaevaporador R210 (Buchi),

conjunto de extrusão 610023 (Avanti Polar Lipids), espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu), microcentrífuga MiniSpin (Eppendorf) e liofilizador L 120 (Liotop), coluna de vidro para cromatografia aberta (Satelit), placa de sílica suportada em alumínio com indicador fluorescente de 254 nm (Sigma Aldrich), microcubeta de quartzo UV de 2 janelas polidas com 10 mm de caminho óptico (Sigma Aldrich).

4.2.3 - Copal de *H. courbaril* (jatobá): As amostras do copal do jatobá foram coletadas casualmente na superfície do solo sob a copa de uma árvore adulta de *H. courbaril* em uma área de Cerrado, em propriedade particular nas proximidades do Lago de Serra da Mesa-GO por meio de autorização para acesso a patrimônio genético n°. 02001.007580/2014-95 (Anexo I).

4.3 - Métodos

4.3.1 - Fluxograma metodológico: Com a finalidade de facilitar o entendimento das etapas metodológicas seguidas, um fluxograma metodológico (Figura 22) foi criado para resumir as etapas de preparação das amostras e métodos de análise empregados.

Fluxograma metodológico

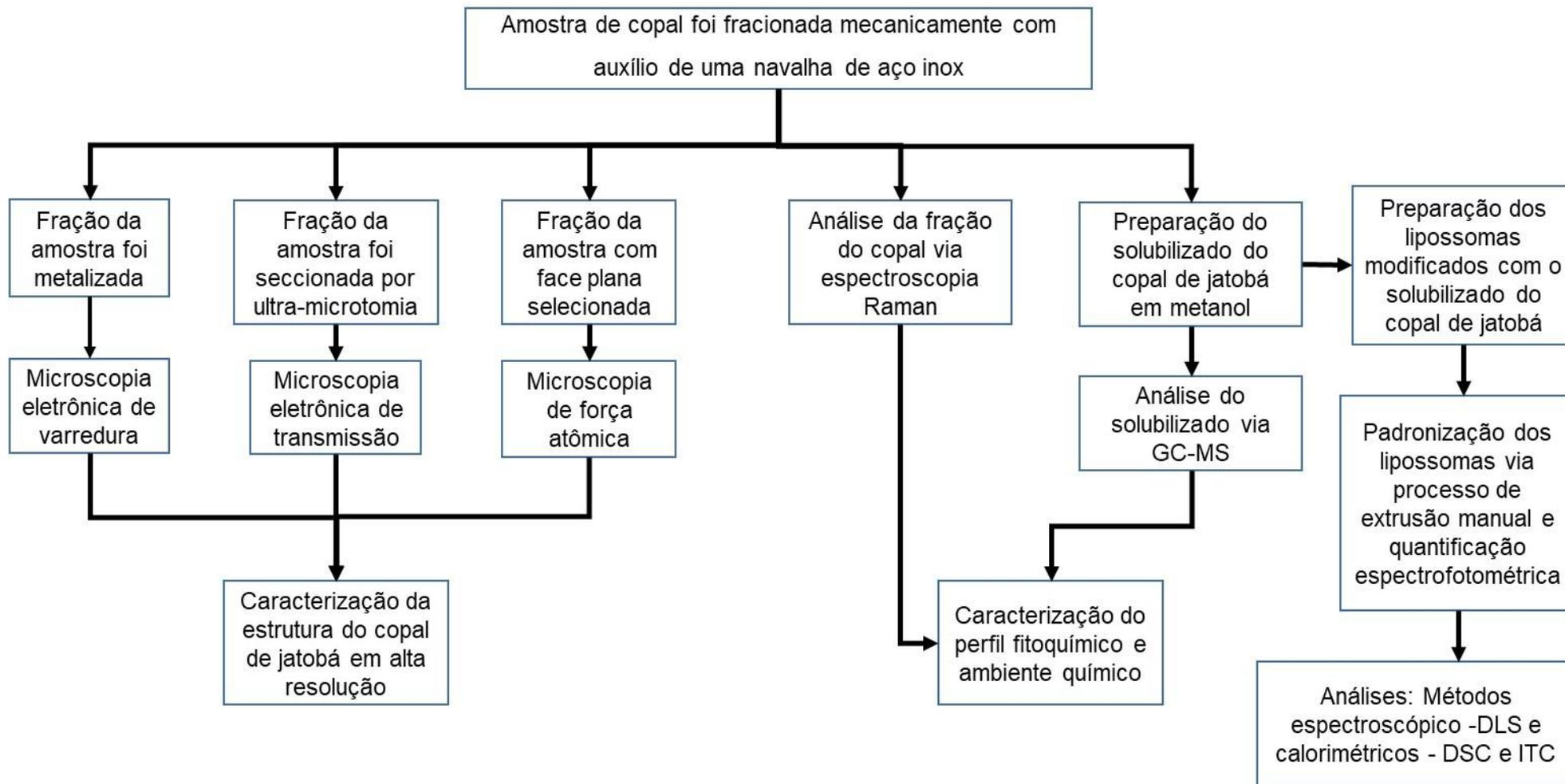


Figura 22. Fluxograma metodológico exemplificando as etapas de preparação das amostras e métodos de análise empregados.

4.4 - Solubilizado do copal de jatobá: Após trituração de uma fração da amostra de copal, 10 mg do pó foram dissolvidos em metanol aquecido a 70°C. Após a completa dissolução do copal o volume foi aferido para 10 mL. A dissolução do copal também foi testada com os seguintes solventes: acetona, clorofórmio, hexano, diclorometano, éter dietílico, éter de petróleo, acetato de etila, acetonitrila, etanol e água. Nestes solventes não foi possível realizar a solubilização da amostra de copal.

4.5 - Protocolo de preparação do cariolanol: 1,0 g do β -cariofileno comercial foram transferidos para um balão de fundo redondo seguidos da adição de 20 mL de éter dietílico e 1,4 mL de ácido sulfúrico concentrado e mantidos sob constante agitação via barra magnética por 72 h. Após este período adicionou-se de 10 mL de água para diluição do volume. éter de petróleo. Em seguida a solução foi transferida para um funil de separação onde procedeu-se o processo de extração líquido-líquido com a adição de 5 mL de éter de petróleo, este procedimento foi repetido três vezes para maximizar o processo de extração. A fase orgânica foi separada, coletada e evaporada em rotaevaporador. O resíduo seco foi solubilizado com diclorometano e fracionado em coluna aberta de cromatografia utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel uma solução de éter de petróleo com 20% de éter etílico. Durante a cromatografia a coluna foi pressurizada com nitrogênio gasoso para agilizar a coleta das frações. Foram coletadas 40 frações em tubos de ensaio de vidro de 15 mL numerados sequencialmente e analisadas via cromatografia de camada fina utilizando como fase móvel diclorometano e no processo de revelação dos spots o ácido fosfomolibdênico. O cariolanol foi identificado nas frações de 30 a 35. Estas frações foram secas em rotaevaporador, resultando em um pó branco. O rendimento da reação foi de 0,12 mg.

4.6 - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS): Dois μL do solubilizado do copal de jatobá foram injetados no modo Split em uma coluna capilar Restek Rtx-5-MS de 30 m, utilizando hélio como gás de arraste. O modo de ionização foi de impacto eletrônico com uma rampa de aquecimento de 50 a 250°C e taxa de aquecimento de 4°C por min. Os dados foram adquiridos em modo Scan na faixa de 40 a 600 Da. Os dados de fragmentação foram analisados em comparação com o padrão de β -cariofileno e com o banco de dados NIST Standard Reference Database 1A Versão 2.0d (2005) para a identificação dos componentes moleculares presentes.

4.7 - Microscopia de força atômica (MFA): Fragmentos finos e planos da amostra do copal de jatobá foram obtidos pelo seccionamento da amostra com uma lâmina de metal. Os fragmentos gerados obedeciam ao plano de corte da lâmina e não era necessário que a lâmina transpassasse toda a amostra. A própria tensão mecânica na região entre a amostra e a lâmina acabava por fraturar a amostra naturalmente. Em seguida os fragmentos que apresentaram as regiões mais planas horizontalmente foram fixados no suporte metálico de análise com auxílio de uma fita adesiva dupla face para posterior análise da superfície em modo contato de operação para obtenção de imagens de altura utilizando ponteiros de nitreto de silício e escâner de deslocamento máximo em XY de 125 μm . Foram adquiridas 10 imagens de 25 μm^2 (5 \times 5 μm) com resolução de 512 \times 512 linhas. As imagens foram processadas simplesmente quanto à correção de plano XY, utilizando o software que acompanha o equipamento em modo “*off-line*”.

4.8 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV): As análises de MEV foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica do IB da Universidade de Brasília. Fragmentos planos da amostra foram fixados em suportes de alumínio com auxílio de uma fita dupla face de carbono e submetidas a um processo de metalização com vapor de ouro por 180 s. Foram coletadas 20 imagens da amostra visualizadas com uma voltagem de feixe de 10 kV e as imagens utilizadas correspondem ao sinal obtido por um detector de elétrons secundários.

4.9 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET): As análises de MET foram realizadas no laboratório de bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cortes lapidados em formato piramidal do copal de jatobá foram fixados no suporte apropriado para processo de ultramicrotomia. Foram obtidas seções ultrafinas de 20 nm as quais foram fixadas em grades de cobre de 200 malhas recobertas com película de Formvar. Em seguida as amostras foram contrastadas com acetato de uranila 5% (massa/volume) por 1 h. Foram adquiridas 10 imagens visualizadas com uma voltagem de feixe de 80 kV.

4.10 - Espectroscopia Raman: Uma fração da amostra do copal no seu estado natural foi fixada em um suporte metálico com regulagem nos planos X,Y e Z para o processo de medição. Os espectros foram adquiridos utilizando como fonte de excitação um laser de 785 nm e lente com objetiva de 100× com grande abertura numérica, sendo realizadas 100 aquisições com tempo de integração de 0,2 s para obtenção de cada espectro. Posteriormente foi realizada inspeção manual dos picos e bandas e comparação com a literatura.

4.11 - Protocolo de preparação dos lipossomas: 10 mg do fosfolípido dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) foram diluídos em 2 mL de uma solução de clorofórmio/metanol (2:1) preparadas a partir das soluções individuais concentradas, em um balão de fundo redondo. O filme lipídico foi formado em um rotaevaporador sob vácuo com rotação constante de 75 rpm por um período de 30 min. Em seguida, o balão contendo o filme lipídico foi transferido para um liofilizador por 12 h para remoção de algum resíduo de solvente que tenha restado do processo de rotaevaporação. Após o processo de liofilização, o filme de fosfolídeos foi solubilizado em 2 mL de uma solução de PBS para formação dos lipossomas. A suspensão final contendo os lipossomas foi obtida por processo de extrusão manual para homogeneização das vesículas utilizando membrana com poros em torno de 100 nm. A quantificação dos fosfolídeos foi realizada segundo o protocolo desenvolvido por Stewart (STEWART, 1980).

4.12 - Protocolo de preparação dos lipossomas modificados com solubilizado do copal de jatobá: O processo de preparação dos lipossomas modificados com as proporções de 0,1%, 0,3%, 0,5% (massa/massa) foi semelhante ao descrito no item anterior (4.11). O diferencial nesta preparação foi que o copal do jatobá estava solubilizado no metanol e foi adicionado primeiramente, antes do clorofórmio, durante o processo de solubilização do fosfolípido e seguido pelo processo de formação do filme em rotaevaporador.

4.13 - Protocolo de preparação dos lipossomas modificados com cariolanol: A preparação dos lipossomas modificados com cariolanol foi realizada somente na proporção de 0,3% (massa/massa) foi semelhante ao descrito no item 4.11. O

diferencial nesta preparação foi que o cariolanol estava solubilizado no metanol e foi adicionado primeiramente, antes do clorofórmio em uma proporção de 1:1, durante o processo de solubilização do fosfolípídeo e seguido pelo processo de formação do filme em rotaevaporador.

4.13 - Espalhamento de luz dinâmico (DLS): Após padronização da produção das vesículas pelo processo de extrusão, as suspensões de lipossomas foram diluídas em uma solução de PBS em uma proporção de 1:9 (v/v) e acondicionadas em uma cubeta de poliestireno para análise do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade (Pdl). Os dados foram adquiridos a 25°C em três ciclos de aquisição no modo automático de aquisição utilizando-se um feixe de laser de 633 nm com ângulo incidente de 173°. Os dados apresentados referem-se a média \pm desvio padrão da média, os gráficos foram plotados no programa Origin 7 SR4 (OriginLab Corporation).

4.14 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC): Antes da análise, as amostras foram degaseificadas à vácuo por 10 min. a 25°C, sob agitação e vácuo de 14 psi. A célula de referência foi preenchida com 516 μ L da solução tampão de PBS. A célula experimental com volume de 516 μ L foi preenchida com solução de 500 μ M contendo os lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá nas proporções de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 10%. O gradiente de temperatura variou de 10 a 40°C a uma taxa de 0,5°C por min. Os dados calorimétricos foram obtidos diretamente do termograma via análise no software Origin 7 SR 4 com módulo específico para análise de dados calorimétricos de DSC. Após normalização pela concentração de fosfolípídeos, ajuste da linha de base no modo de conexão linear e

integração da área de acordo com a transição do T_m , utilizando “*fit*” (modo de ajuste) “*Non-2-State*” com dois pontos de referência.

4.15 - Calorimetria de titulação isotérmica (ITC): Antes da análise, as amostras foram degaseificadas à vácuo por 10 min. a 25°C, sob agitação e vácuo de 14 psi. A célula experimental com um volume de 1,43 mL foi totalmente preenchida com uma solução de 200 μM contendo somente lipossomas (titulado). A seringa de titulação foi preenchida com uma solução de 800 μM contendo os lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá (titulante) na proporção de 0,5%. No processo de titulação foram realizadas 28 injeções sucessivas de 10 μL do titulante com um intervalo de 5 min entre cada titulação. Os experimentos no ITC foram realizados a 25°C sob agitação constante de 270 rpm. Os dados calorimétricos foram obtidos diretamente do termograma via análise no software Origin 7 SR 4 com módulo específico para análise de dados calorimétricos de ITC. Após ajuste da linha de base e integração dos picos foram realizados os ajustes de concentração do titulante e titulado para os cálculos das calorias envolvidas no processo reacional em função da razão molar do titulante adicionado durante o processo de titulação.

4.16 – Espectrometria de massa com ionização electrospray: Para verificação da efetividade da síntese do cariolanol, após funcionalização da molécula de β -cariofileno, a fração coletada foi analisada por espectrometria de massa com modo de ionização electrospray positivo. A amostra foi solubilizada em uma solução de acetonitrila/água (1:1) com 0,1% de ácido fórmico e injetada diretamente na fonte de ionização electrospray, utilizando-se uma seringa de vidro sob um fluxo constante de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ controlado por uma bomba de infusão automática. As condições de análise

foram: Modo de ionização electrospray positivo, faixa de m/z : 50 a 500 Da, Energia do capilar: 4,5kV; Energia do cone: 2kV; temperatura de desolvatação: 180°C; fluxo de nitrogênio nebuliser: 0,3 Bar; fluxo de nitrogênio dry-gas: 4 L/min. Os espectros foram analisados após a combinação de 2 min. de análise no seu estado original, ou seja, sem tratamentos ou filtros adicionais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização da amostra do copal de jatobá

5.1.1 - Aspectos visuais

A amostra de copal proveniente de jatobá utilizada apresentou-se como um sólido de aspecto geométrico oval com dimensões irregulares. A amostra apresentou as dimensões de 4,5 cm x 3,4 cm para os eixos longitudinal e transversal principais, respectivamente. A superfície da amostra apresentou coloração castanha e textura rugosa com várias imperfeições (Figura 23-A). A densidade dos copais é próxima à dos âmbares, variando entre 1,04 a 1,13 g/cm³ e com ponto de fusão entre 180 a 340°C. O índice de refração varia entre 1,528 a 1,545 (VÁVRA, 2009). Internamente a estrutura da amostra do copal de jatobá estudada apresentou-se translúcida e com aspecto vítreo (Figura 23-B).

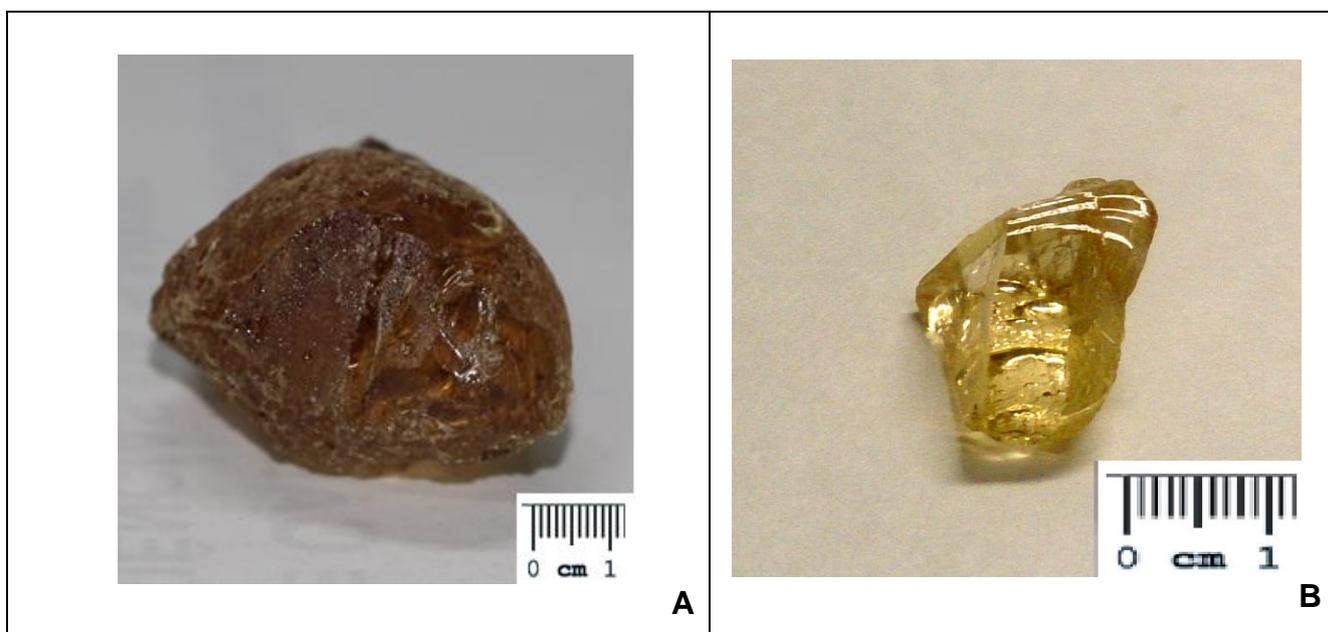


Figura 23-A: Amostra de copal de jatobá bruto utilizado no estudo. **23-B:** Amostra do copal de jatobá fraturada para visualização da parte interna, onde pode-se constatar o aspecto vítreo da amostra.

5.1.2 - Aspectos microscópicos

Considerando as particularidades de cada protocolo de preparação das amostras, fragmentos do copal foram analisados pelas técnicas de MFA, MEV e MET. A Figura 24 apresenta uma imagem adquirida por MFA em uma área de varredura de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, no modo de aquisição contato. Os dados indicam que a superfície da amostra é bem plana e homogênea nessa escala de tamanho visto, que a altura máxima não foi superior a 41,6 nm e a distribuição normal da escala de altura apresentou uma dispersão baixa.

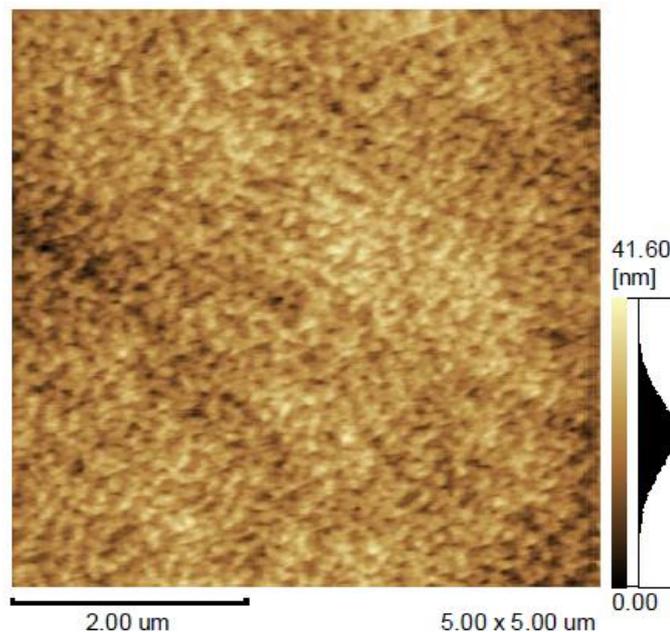


Figura 24. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MFA em modo contato. Área de varredura $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$.

As imagens adquiridas por MEV também foram de fragmentos obtidos por meio de fratura realizada mecanicamente. As Figuras de 25-A a 25-G representam as imagens adquiridas nos seguintes aumentos: 40x, 75x, 450x, 8.000x, 23.000x, 50.000x e 60.000x. As sucessivas ampliações nas imagens de MEV também demonstraram que as amostras do copal de jatobá fraturado mecanicamente

apresentaram-se planas e regulares. Estes dados corroboram com o comportamento observado nas análises realizadas por MFA. Ou seja, não há grandes variações na topografia da superfície interna da amostra, exceto em pontos danificados mecanicamente.

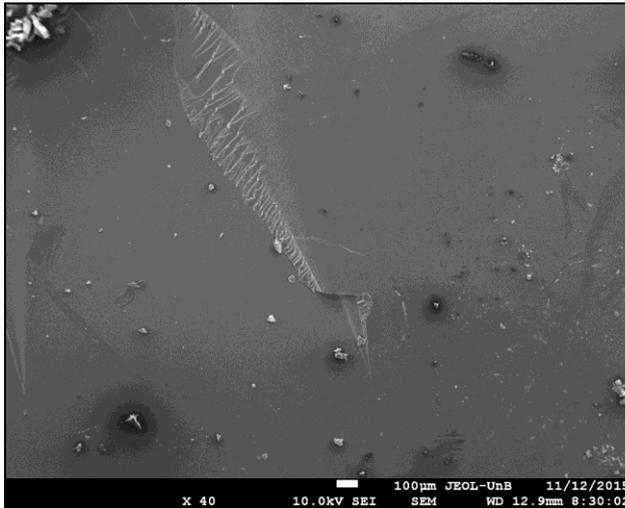


Figura 25-A. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 40×.

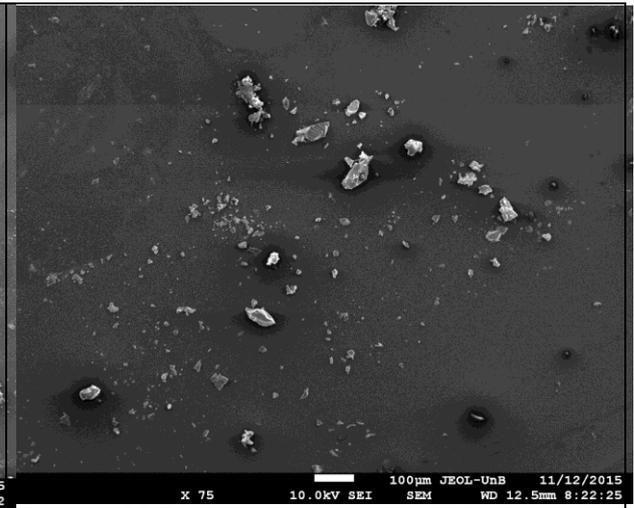


Figura 25-B. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 75×.

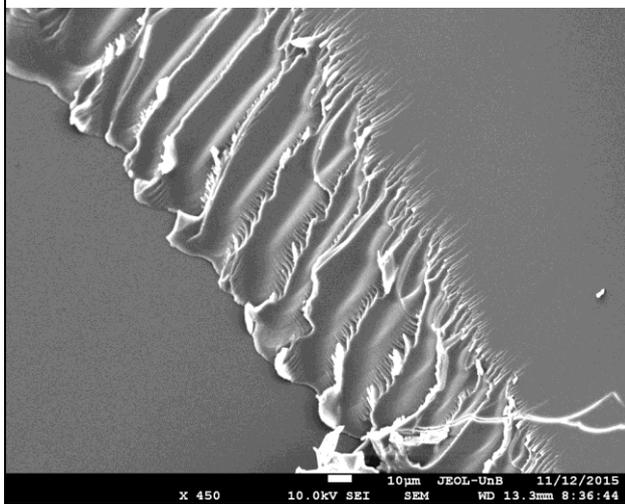


Figura 25-C. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 450×.

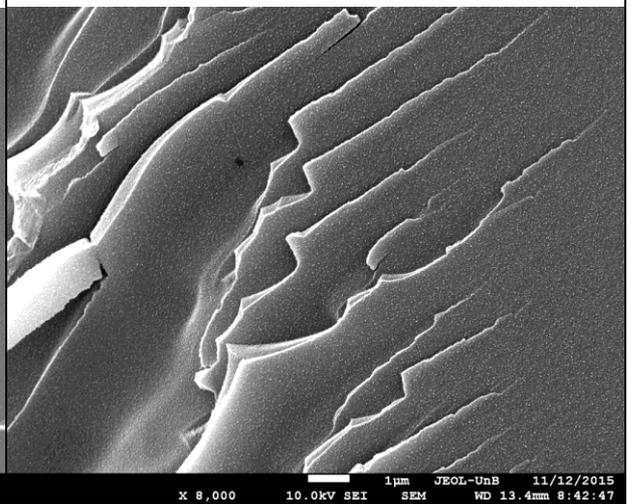


Figura 25-D. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 8.000×.

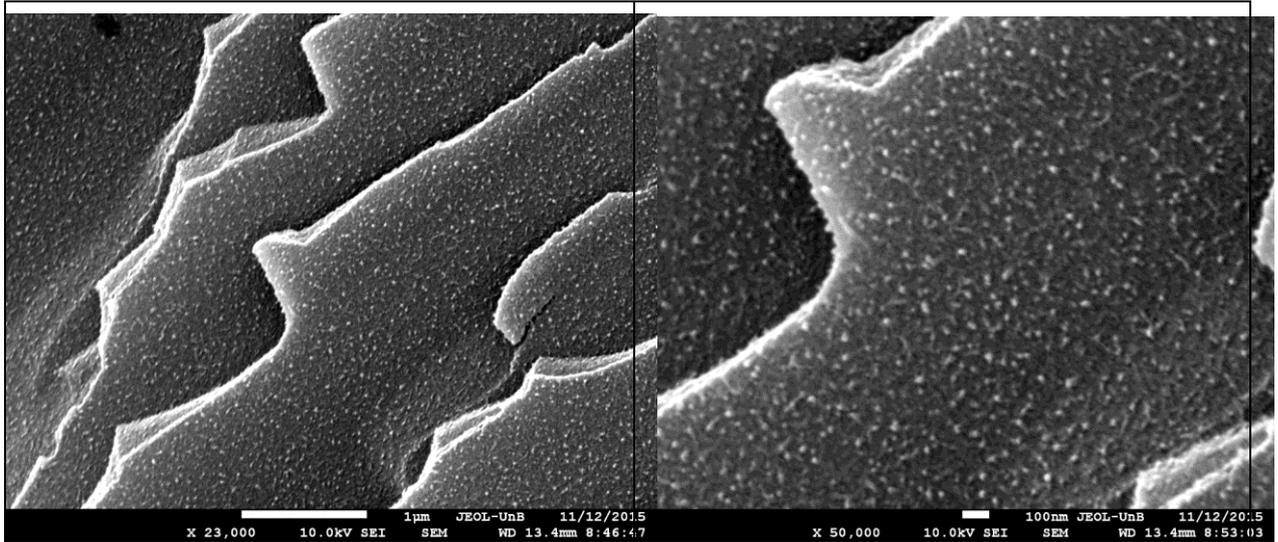


Figura 25-E. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 23.000 \times .

Figura 25-F. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 50.000 \times .

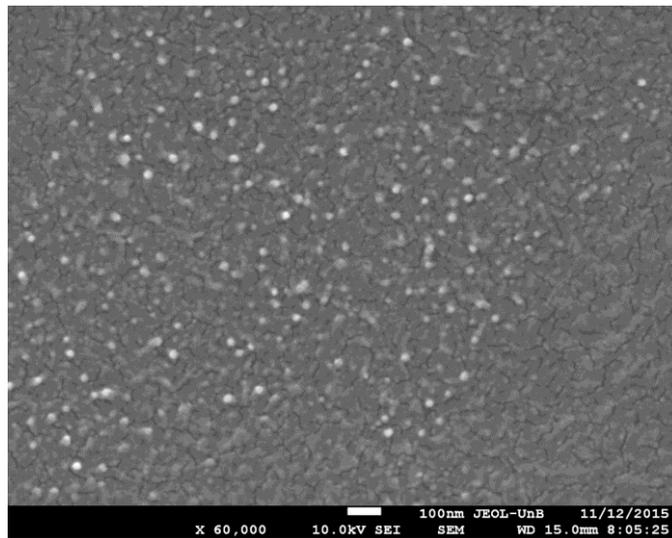
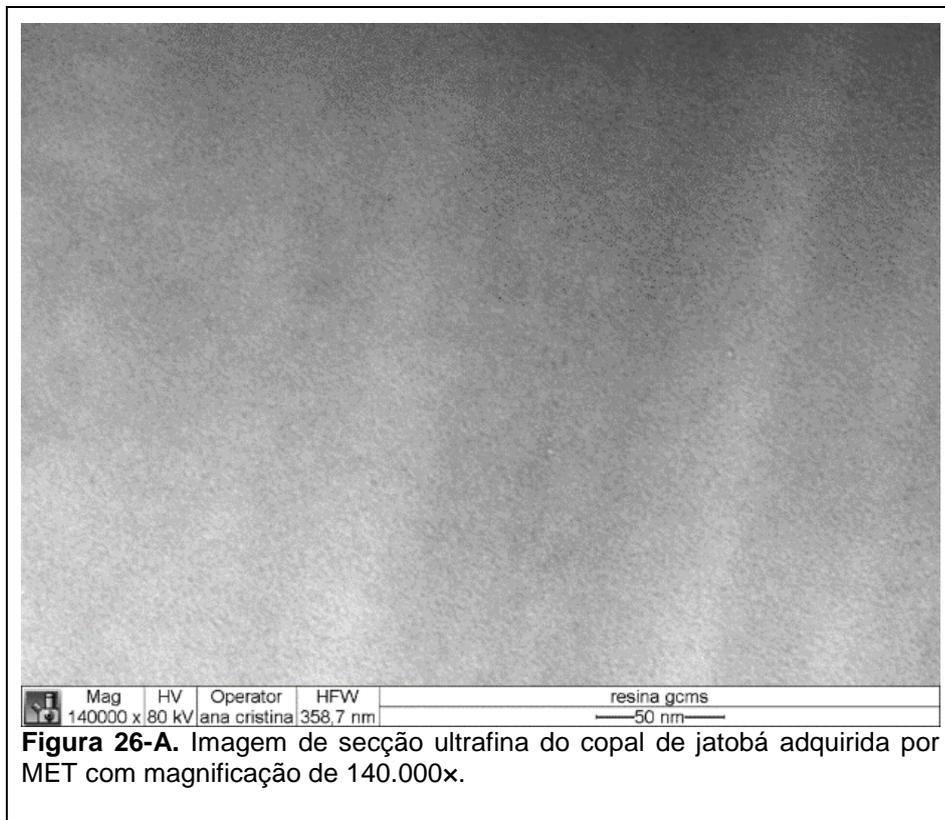
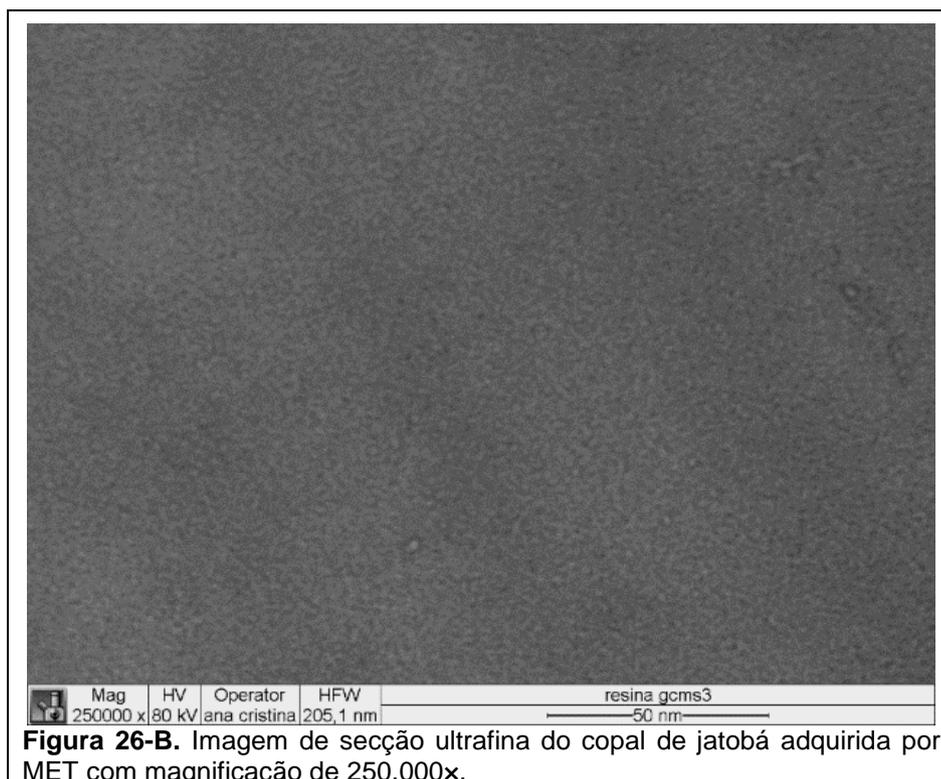


Figura 25-G. Imagem da superfície fraturada interna do copal de jatobá adquirida por MEV com aumento de 60.000 \times .

Também foram adquiridas imagens por meio de MET de secções ultrafinas do copal de jatobá. As Figuras 26-A e 26-B foram adquiridas com aumentos de 140.000x e 250.000x, respectivamente. Pelas imagens obtidas por MET, não é possível avaliar se o copal apresenta alguma organização cristalina interna em nível molecular, ainda que a organização já tenha sido confirmada por MFA e MEV. Para tal finalidade seria necessária, futuramente, a utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão em alta resolução.





Em um comparativo dos resultados obtidos pelas técnicas de microscopia, as imagens adquiridas pela técnica de MFA mostraram-se mais adequadas para avaliar a superfície topográfica deste tipo de amostra. Pode-se observar que a altura média de 40 nm indica uma variação que está dentro dos padrões dos materiais que apresentam padrão nanoestruturado.

Em 2011, Barletta e Wandelt analisaram amostras de âmbar provenientes da região do Mar Báltico utilizando MFA sob alto vácuo. Para esta amostra, não foi possível observar qualquer arranjo nanocristalino apesar dos autores terem tido sucesso na obtenção de imagens de boa qualidade deste âmbar que foi considerado amorfo (BARLETTA; WANDEL, 2011).

Os resultados obtidos para o copal de jatobá pelas técnicas microscópicas estão de acordo com os resultados de uma pesquisa realizada por Golubev e Martirosyan em 2012 para outras espécies produtoras de resinas. Naquele trabalho os autores utilizaram as mesmas técnicas para avaliar resinas de plantas da região

norte da Eurasia. No entanto, as amostras avaliadas eram mais antigas, enquadrando-se na classificação dos ambares (GOLUBEV; KOVALEVA, 2012).

5.1.3 - Análise da composição fitoquímica do copal de jatobá por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

A Figura 27 apresenta o cromatograma de massa para amostra de resina solubilizada em metanol. Os espectros de massa das frações indicadas como **A** (14,5 min), **B** (15 min) e **C** (16,7 min) foram selecionados para comparação visando à determinação de identidade molecular contra o banco de dados do NIST disponível para análise comparativa de acordo com padrão de fragmentação. Os sinais visualizados antes dos 5 min e após os 20 min correspondem ao sinal do solvente e ao “sangramento” da fase estacionária da coluna, respectivamente.

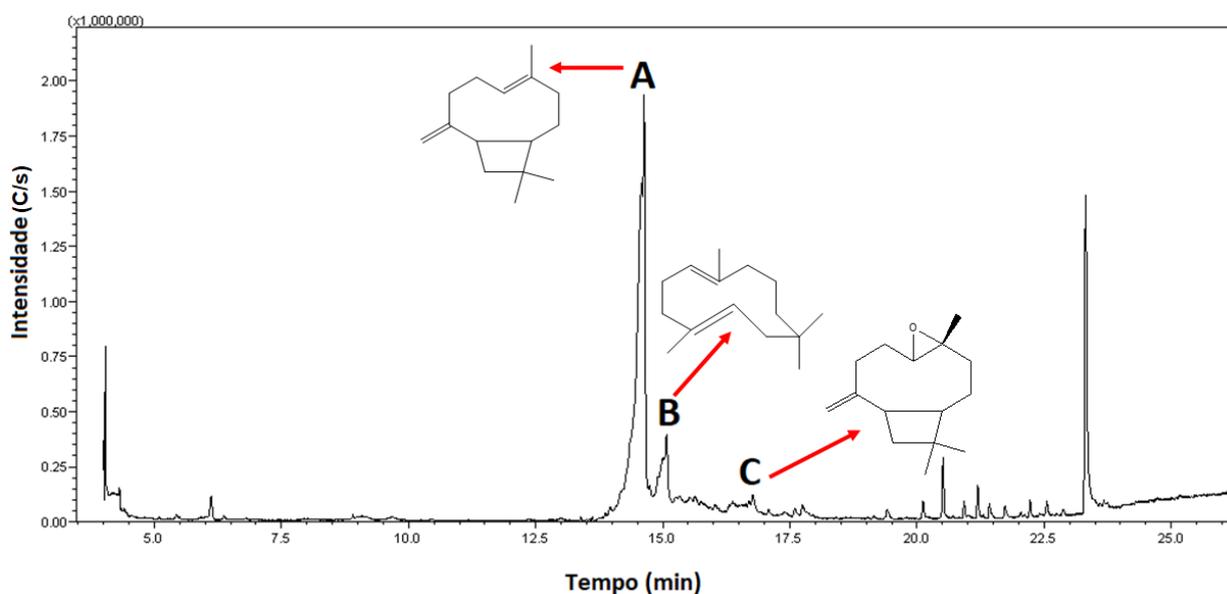


Figura 27. Cromatograma de massa obtido por GC-MS a partir da amostra do copal de jatobá. De acordo com esta identificação, a fração majoritária **A** da amostra refere-se à molécula de β -cariofileno, a fração **B** ao humuleno e a fração **C** ao óxido do β -cariofileno.

De acordo com os padrões de fragmentação disponíveis no banco de dados do NIST e comparação com o tempo de retenção do padrão de β -cariofileno, as frações destacadas na Figura 27 pelas letras A, B e C correspondem homologamente as moléculas do β -cariofileno, humuleno e óxido do β -cariofileno, respectivamente.

Pelas análises das áreas das frações identificadas no cromatograma de massa, pode-se inferir qualitativamente que a molécula de β -cariofileno é majoritária na composição do solubilizado do copal de jatobá. Em uma análise comparativa, fixando a área da fração A como 100%, as moléculas de humuleno (fração B) e óxido do β -cariofileno (fração C), apresentaram áreas de 10% e 0,9%, respectivamente.

5.1.4 - Análise do copal de jatobá por espectroscopia Raman

Um fragmento da amostra do copal do jatobá foi analisado por espectroscopia Raman utilizando-se um feixe de laser com comprimento de 785 nm. A Figura 28 apresenta o espectro adquirido durante a análise.

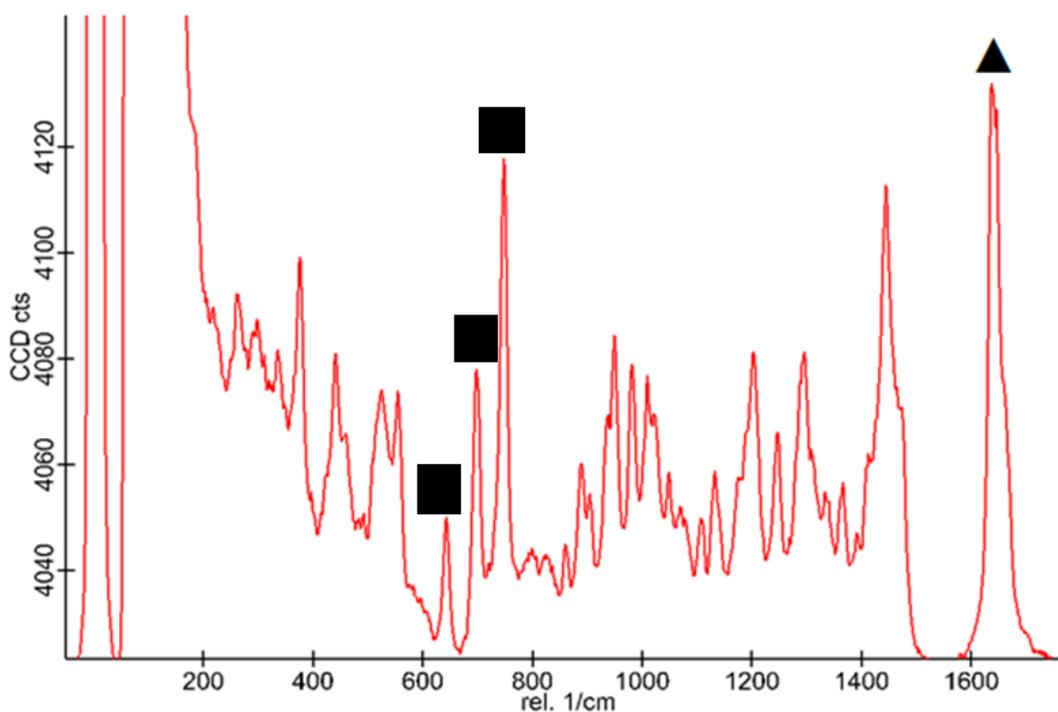


Figura 28. Espectro Raman da amostra do copal de jatobá adquirido com laser de 785 nm. As setas indicadas são descritas na Tabela 5.

Segundo Schulz et al para a molécula de cariofileno são observados os seguintes estiramentos indicados na Tabela 5 (SCHULZ et al., 2005):

Tabela 5. Estiramentos característicos da molécula de cariofileno por espectroscopia Raman.

Composto	FT-Raman (cm ⁻¹)	Ligação
Cariofileno	1670 ▲	ν (C=CH)
	1632 ▲	ν (C=CH ₂)
	600 – 800 ■	Ausência de anéis de 6 membros

Os dados obtidos pela espectroscopia Raman, corroboram com os dados de CG-MS, indicando que os estiramentos de maior intensidade no espectro da Figura 28 e destacados na tabela 5, são característicos da molécula de cariofileno, indicando sua presença majoritária na composição da amostra do copal de jatobá.

5.2 - Efeitos do solubilizado do copal de jatobá em lipossomas

5.2.1 - Análise por espalhamento de luz dinâmico dos lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá

A possível influência da presença do solubilizado do copal de jatobá nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,5% (massa/massa) em miméticos de membranas biológicas constituídas por DMPC foi avaliada pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. As Figuras 29 a 32 demonstram as alterações no diâmetro hidrodinâmico em número das vesículas após processo de extrusão em membrana de 100 nm.

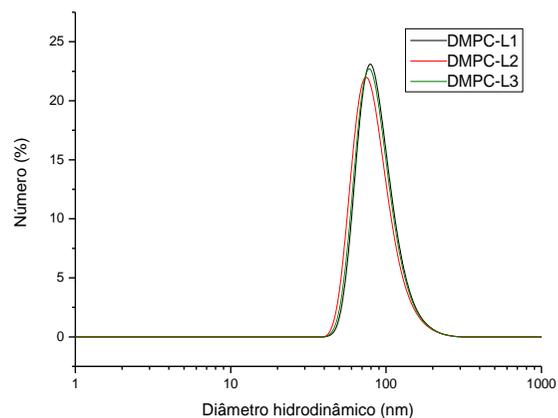


Figura 29. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos somente por DMPC sem adição do solubilizado do copal de jatobá.

Diâmetro hidrodinâmico (Z-average): $121,06 \pm 0,93$ nm
Pdl: $0,093 \pm 0,007$

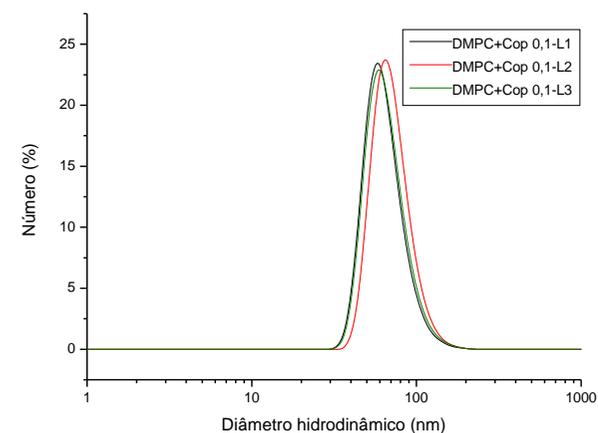


Figura 30. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,1% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá.

Diâmetro hidrodinâmico (Z-average): $95,69 \pm 0,58$ nm
Pdl: $0,086 \pm 0,015$

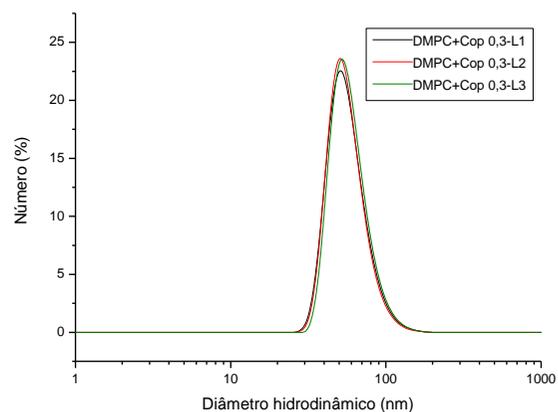


Figura 31. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,3% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá.

Diâmetro hidrodinâmico (Z-average): $87,07 \pm 0,25$ nm
Pdl: $0,115 \pm 0,005$

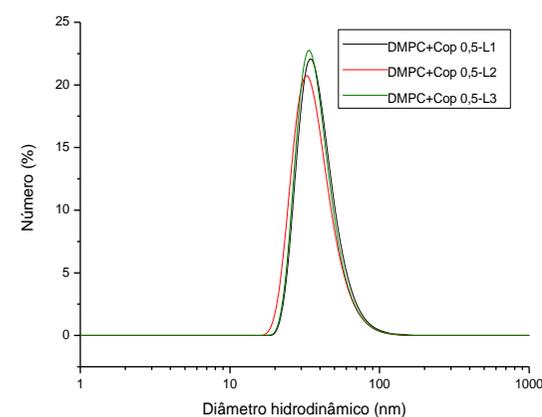
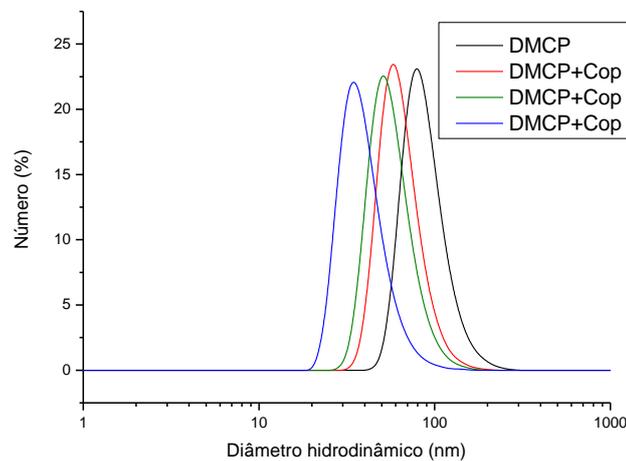


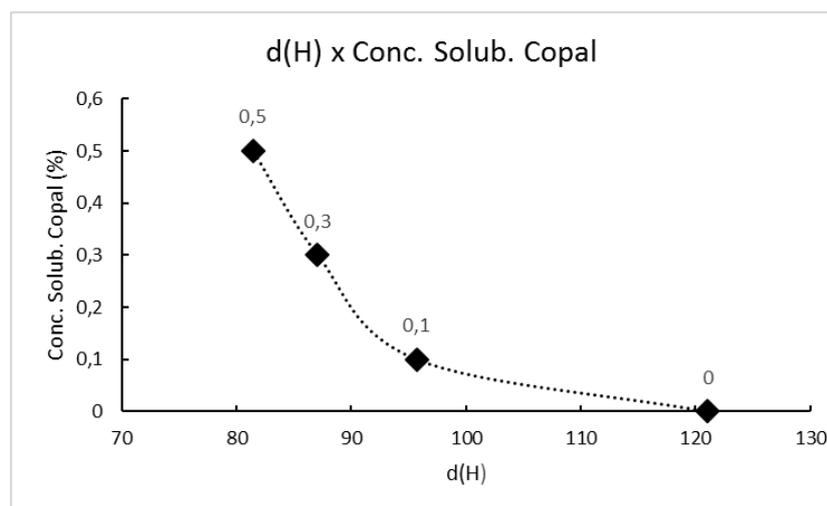
Figura 32. Diâmetro hidrodinâmico de suspensão de lipossomas constituídos por DMPC+0,5% (m/m) do solubilizado do copal de jatobá.

Diâmetro hidrodinâmico (Z-average): $81,42 \pm 0,36$ nm
Pdl: $0,194 \pm 0,005$

As Figura 33-A e B representam um comparativo direto entre os diâmetros hidrodinâmicos das suspensões de lipossomas constituídos somente por DMPC (Figura 29) e DMPC + solubilizado do copal de jatobá nas concentrações mencionadas nas Figuras 30, 31 e 32. Os resultados indicam que o aumento da concentração dos componentes do copal de jatobá em miméticos da membrana constituída por DMPC, causa um efeito concentração dependente na diminuição no diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas. Por outro lado, os Pdl tiveram um aumento dependente do aumento da concentração de solubilizado de copal nos ensaios.



33-A



33-B

Figura 33-A.: Comparativo entre os Lipossomas constituídos somente por DMPC e DMPC + solubilizado do copal de jatobá nas concentrações de 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5% (m/m). **33-B.:** Gráfico ilustrando a diminuição do d(H) de acordo com o aumento da concentração do solubilizado do copal de jatobá nas concentrações de 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5% (m/m) em lipossomas de DMPC.

O decréscimo no diâmetro hidrodinâmico observado de acordo com o aumento da concentração do solubilizado do copal do jatobá é um fato observado também em outros trabalhos que envolvem a incorporação de terpenos na bicamada lipídica. Este decréscimo é atribuído principalmente a redução das forças atrativas de van der Waals e aumento das forças repulsivas resultantes do aumento das forças eletrostáticas, impedimentos históricos e energias de hidratação (KASZUBA et al., 2008; RANGSIMAWONG et al., 2014).

5.2.2 - Análise calorimétrica dos lipossomas modificados com o solubilizado do copal de Jatobá por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Pela técnica de DSC foram avaliados os efeitos causados pela presença do extrato da copal do jatobá nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5% (m/m) nas transições de fase dos miméticos de membrana biológica de DMPC. A Figura 34 representa o termograma de DSC em lipossomas constituídos somente por DMPC.

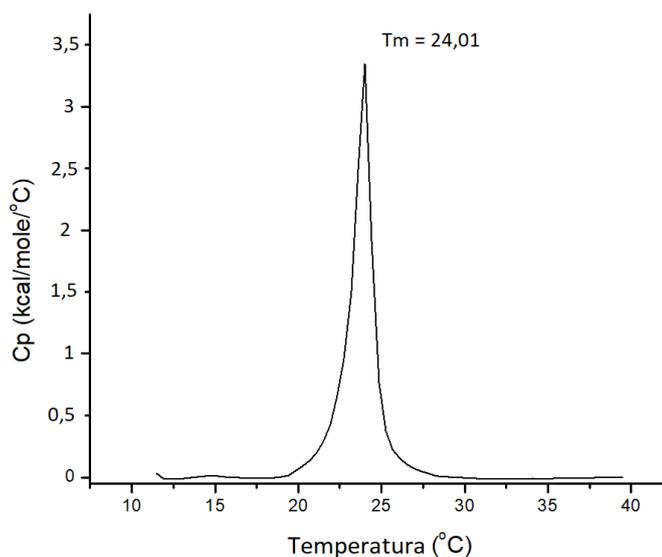


Figura 34. Termograma adquirido por DSC a partir de suspensão de lipossomas constituídos somente por DMPC.

As Figuras de 35 a 37 representam os termogramas de DSC em lipossomas constituídos por DMPC com a adição do solubilizado do copal de jatobá nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5%, respectivamente.

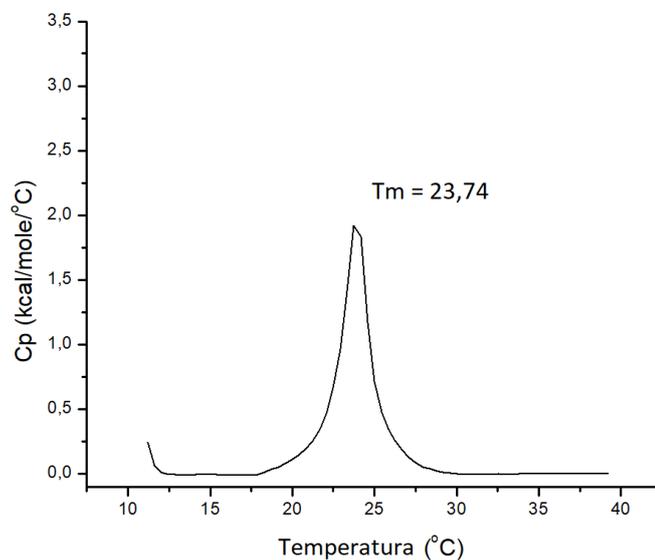


Figura 35. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,1%.

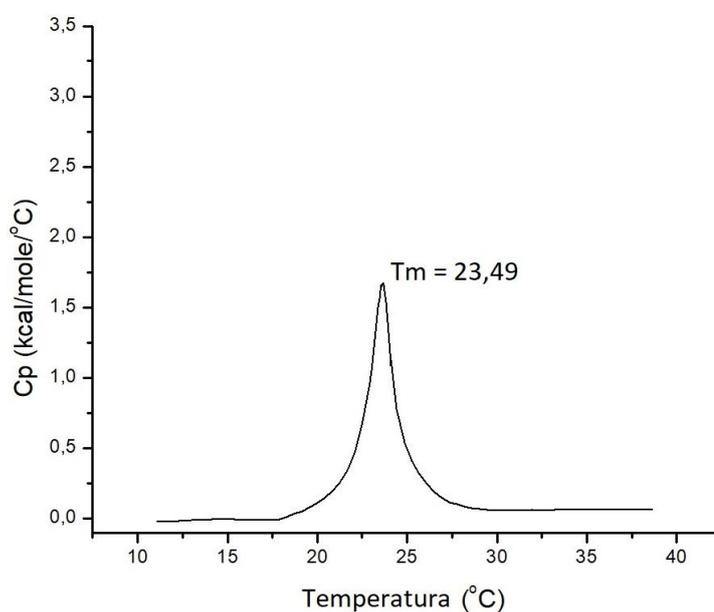


Figura 36. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,3%.

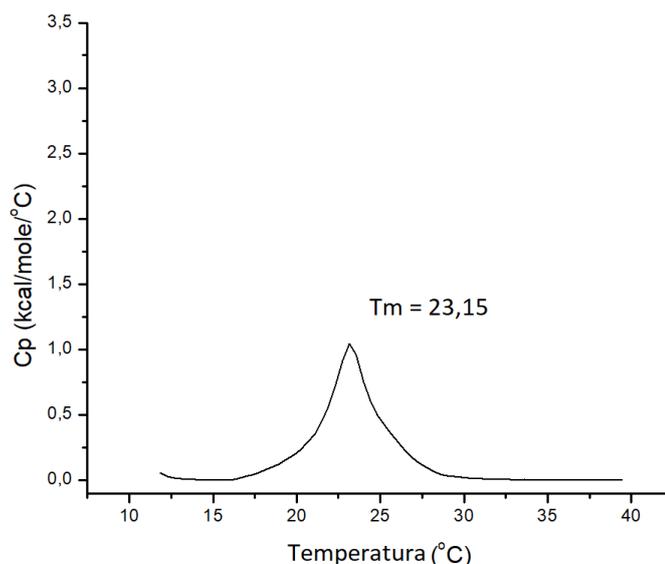


Figura 37. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,5%.

Os dados calorimétricos adquiridos nas análises por DSC dos lipossomas puros e dos lipossomas modificados com o solubilizado do copal de Jatobá nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5% estão descritos na Tabela 6.

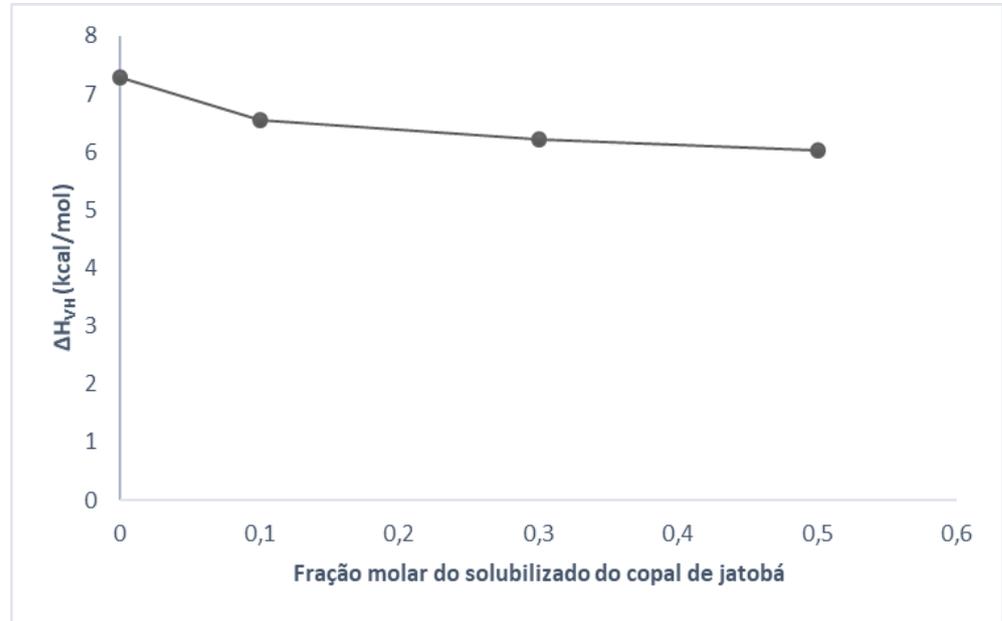
Tabela 6. Compilação dos dados calorimétricos adquiridos por meio de DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + solubilizado do copal de jatobá em diferentes concentrações.

Amostra	T _m (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_{VH} (kcal/mol)
DMPC	24,01	5,67	0,237	1,25	7,286
DMPC + 0,1 %	23,74	4,96	0,200	2,10	6,557
DMPC + 0,3 %	23,49	4,28	0,182	2,48	6,223
DMPC + 0,5 %	23,15	3,92	0,169	2,92	6,024

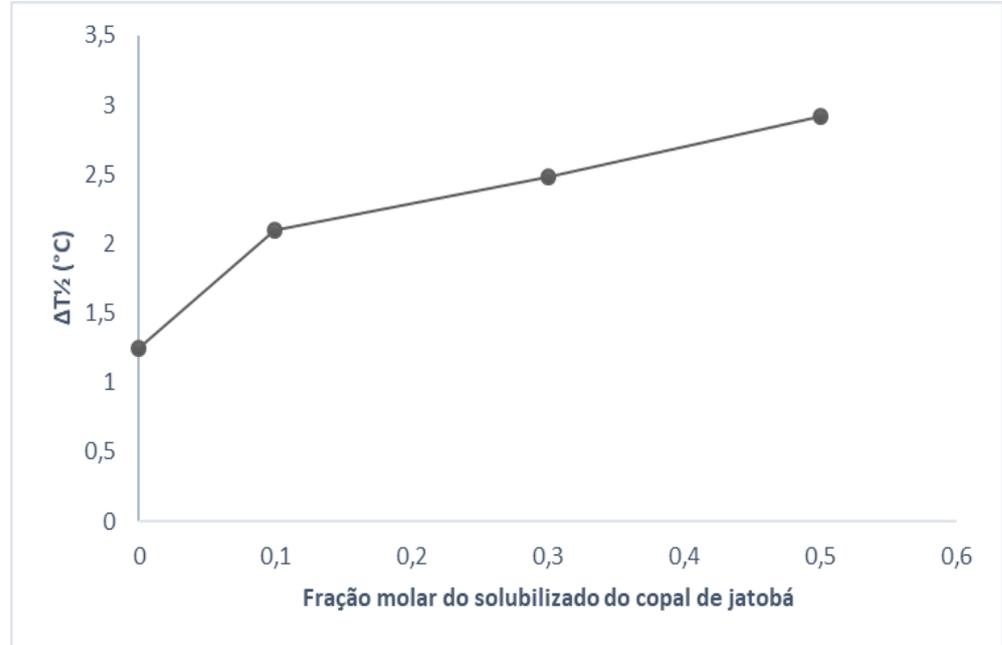
Os dados de ΔH_{VH} demonstram que a interação entre as moléculas presentes no solubilizado do copal de jatobá e os fosfolídeos estão desestabilizando a estrutura da bicamada. As Figuras 38-A e B correlacionam a fração molar do copal de jatobá com os dados da coluna ΔH_{VH} e $\Delta T_{1/2}$, respectivamente. Na Figura 38-A é possível observar que as variações de ΔH_{VH} são inversamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal, enquanto na

Figura 38-B as variações de $\Delta T_{1/2}$ são diretamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal de jatobá.

38-A



38-B



Figuras 38-A: Gráfico ilustrando que os valores de ΔH_{VH} são inversamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal de jatobá. **38-B:** Gráfico ilustrando que os valores de $\Delta T_{1/2}$ são diretamente proporcionais ao aumento da fração molar do copal de jatobá.

Este tipo de comportamento está de acordo com dados experimentais de trabalhos da literatura que correlacionam as interações entre a estrutura anfifílica do fosfolípídeo com diversas moléculas. Como exemplo, podem ser citados o colesterol ou até mesmo fármacos anti-inflamatórios. O resultado destas interações aumenta a fluidez da membrana devido aos seguintes fatores: aumento da entropia devido ao aumento na desordem rotacional das ligações; aumento da entropia molecular; e aumento no grau de hidratação na parte polar da estrutura dos fosfolípídeos (HONG; KIM; LIM, 2015; JELESAROV; BOSSHARD, 1999; LUCIO; LIMA; REIS, 2010).

Os resultados obtidos por DSC corroboram os resultados observados no trabalho realizado por Sarpietro et al 2015, onde foram avaliadas as interações entre lipossomas constituídos por DMPC com os padrões de β -cariofileno e óxido de β -cariofileno. Os autores concluíram que ambas as moléculas interagem com os fosfolípídeos das vesículas, destacando que a interação da molécula do β -cariofileno tem uma capacidade maior de afetar a transição de fase quando comparada com o óxido de β -cariofileno, provavelmente devido a sua melhor interação com a porção apolar do fosfolípídeo (SARPIETRO et al., 2015)

A Figura 39 faz referência a avaliação por ITC de uma amostra de lipossomas constituído somente por DMPC (titulado) ao qual foram adicionados os lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá (titulante) na concentração de 0,5%. Os resultados da troca de calor (em kcal/mol) por ITC, no entanto, indicam que após a formulação do lipossoma, a mobilidade dos terpenos é muito baixa devido a não capacidade de interação destas com a porção polar do fosfolípídeo, logo a chance de ocorrer um processo de difusão entre um lipossoma puro o lipossoma modificado é muito baixa nestas condições. Pela análise do gráfico ainda é possível concluir que as trocas de calor registradas devem-se principalmente a diluição do meio que está ocorrendo durante as sucessivas adições do titulante (BRAND, 2007).

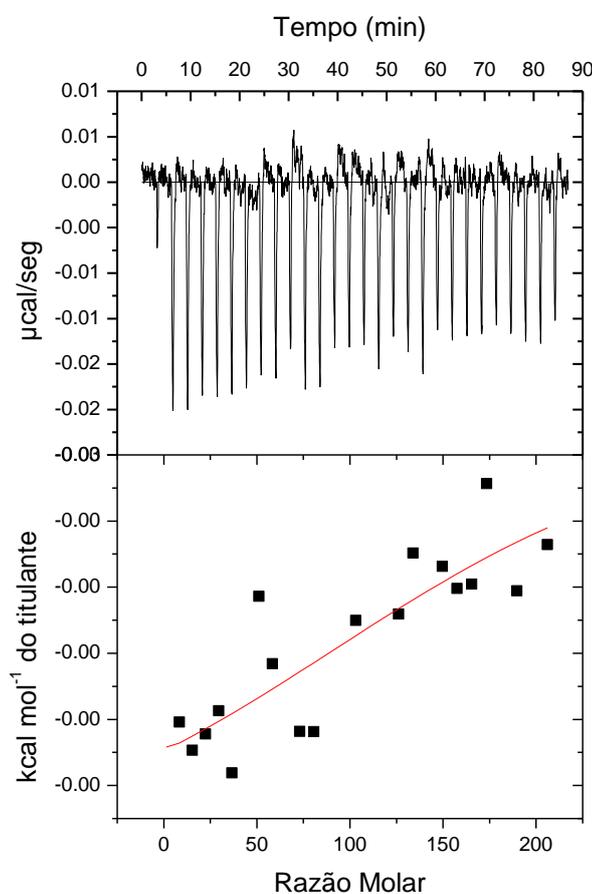


Figura 39. Termograma adquirido por ITC entre lipossomas constituídos por DMPC (titulado) e lipossomas modificados com o solubilizado do copal de jatobá na concentração de 0,5% (titulante).

5.2.3 - Síntese do cariolanol e análise calorimétrica dos lipossomas modificados com o cariolanol por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O processo de síntese do cariolanol foi executado de acordo com o roteiro descrito no material suplementar da publicação de Chicca et al (2014). De acordo com este procedimento, é possível funcionalizar via processo de hidroxilação, a molécula de β -cariofileno.

Assim, espera-se que após este processo de síntese, ocorra uma redução no caráter apolar da molécula de β -cariofileno, em função do deslocamento da carga indutiva devido à presença do átomo de oxigênio e rearranjos nas duplas ligações.

Os objetivos desta síntese eram:

a) Obtenção de uma molécula funcionalizada quimicamente via reação de hidroxilação, com uma estrutura homóloga à do β -cariofileno;

b) Quais seriam os dados experimentais obtidos da interação desta molécula de cariolanol com os lipossomas de DMPC, em função de possíveis rearranjos moleculares dos átomos de carbono, devido a existência de duplas ligações em carbonos próximos.

Estas modificações estão destacadas nas Figuras 40-A e 40-B.

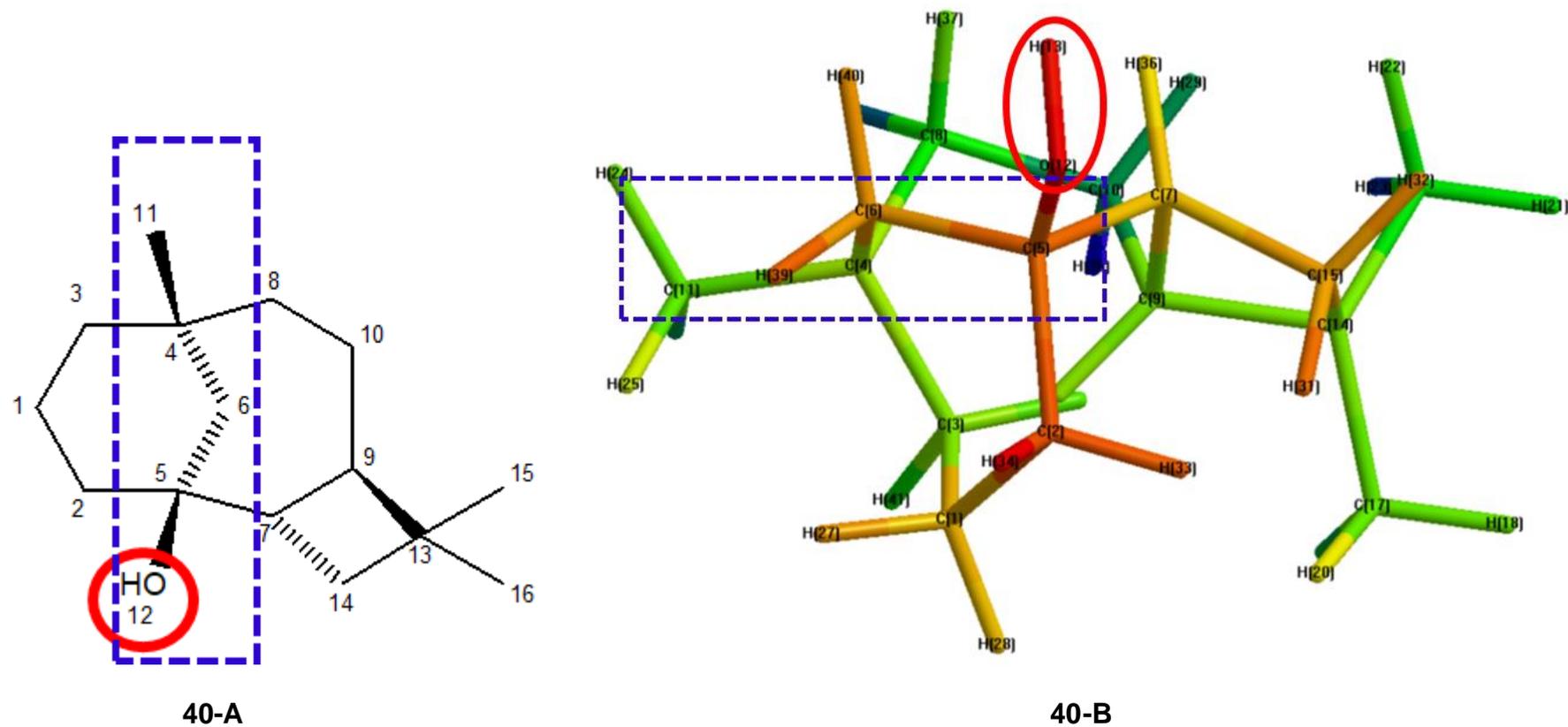


Figura 40-A.: Estrutura do cariolanol destacando a funcionalização pelo processo de hidroxilação (destacado em vermelho) e rearranjo das duplas ligações (destacado em azul). **40-B.:** Representação da molécula do cariolanol em 3D, destacando as mesmas modificações da figura 40-A.

Algumas considerações sobre a diferença entre o resultado esperado e o obtido relacionam-se a porcentagem de rendimento da reação. De acordo com a descrição do artigo, o rendimento obtido pelos autores foi superior à 35%. No entanto o resultado experimental obtido foi inferior a 11%, visto que a massa do material obtido após uma etapa de purificação em coluna aberta foi de apenas 0,12mg. O baixo rendimento pode ser explicado pelo grau de pureza do padrão e dos reagentes utilizados no processo de síntese. A Figura 41 ilustra uma placa de TLC durante o processo de identificação das frações coletadas após fracionamento da amostra em coluna aberta.

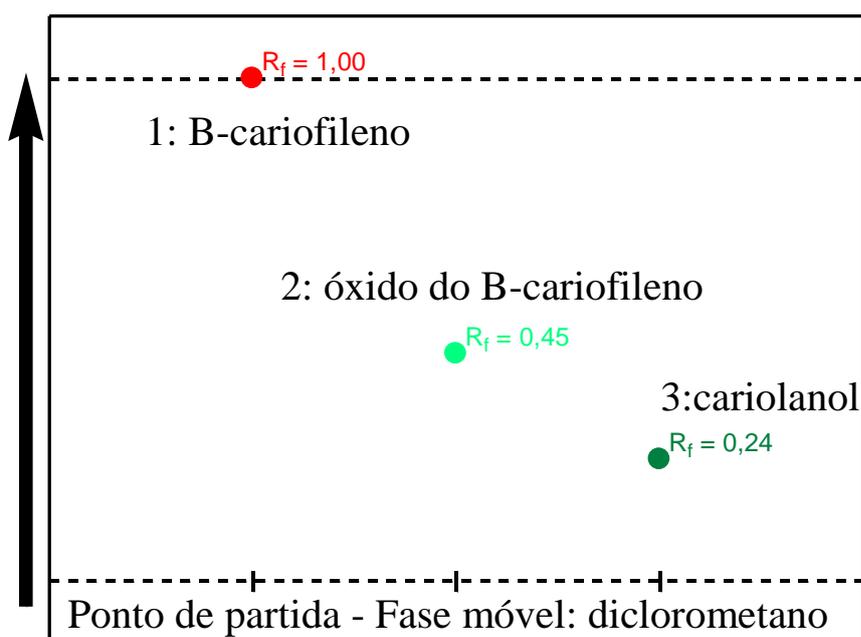
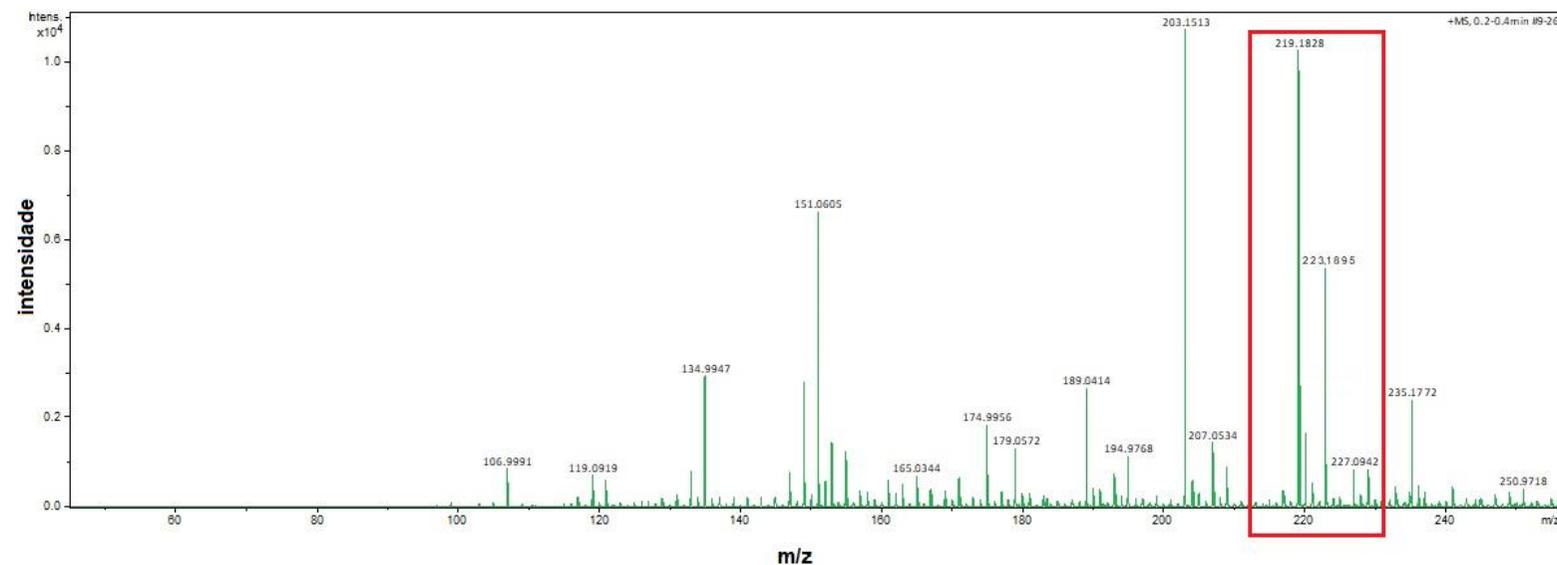


Figura 41. Ilustração do processo de identificação das frações via placa de TLC após fracionamento da amostra em coluna de cromatografia aberta. Ponto 1: β -cariofileno; Ponto 2: óxido do β -cariofileno; e Ponto 3: cariolanol.

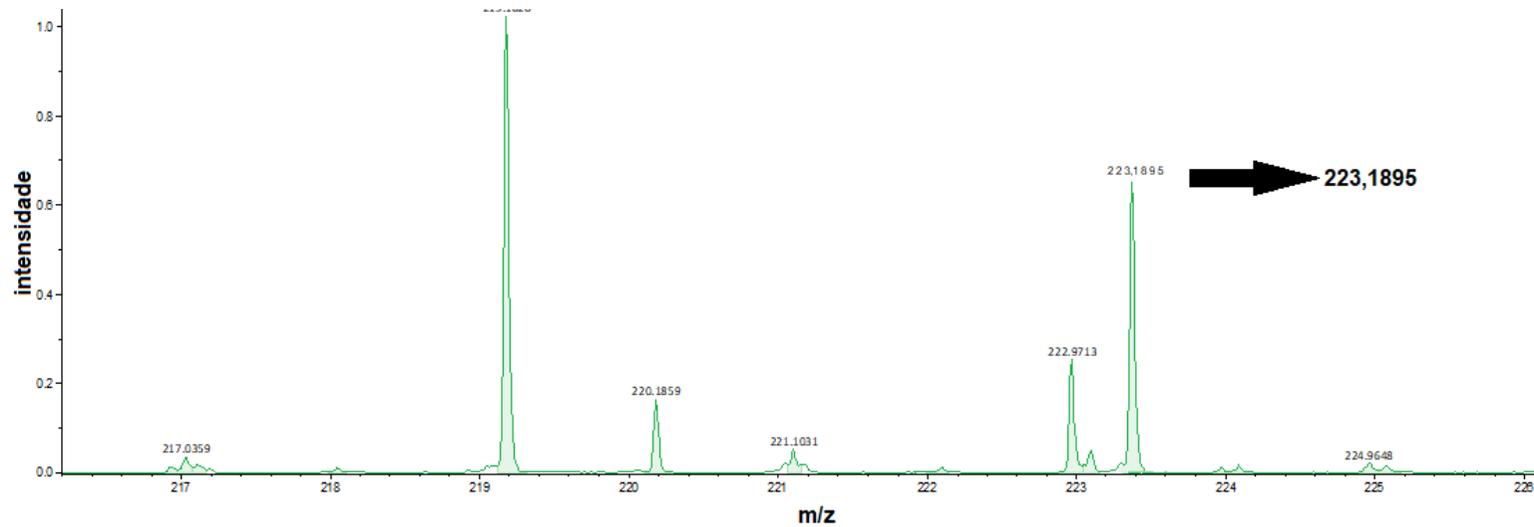
Uma fração do material foi utilizada para verificação do resultado dos produtos da síntese por espectrometria de massa no modo de ionização electrospray positivo.

O espectro de massa geral da fração está ilustrado na Figura 42-A e a ampliação da região destacada em vermelho é ilustrada na Figura 42-B. Ainda na Figura 42-B, o sinal de 223,1895 Da destacado, corresponde a massa da molécula de cariolanol com a adição de 1 próton, no formato MH^+ .

Outro aspecto observado na Figura 42-A é a predominância do β -cariofileno como íon majoritário no espectro de massa, fato que pode explicar o motivo do baixo rendimento da reação. Cabe ainda avaliar se o tempo de 72 horas que foi utilizado no processo reacional precisa ser ampliado com o objetivo de melhorar o rendimento da reação.



42-A



42-B

Figura 42-A: Espectro de massa total da fração contendo o cariolanol, coletado após purificação em coluna de cromatografia aberta. **42-B:** Ampliação da região do espectro em destaque na cor vermelha da Figura 42-A, destacando a massa do cariolanol com a adição de 1 próton.

A avaliação do tipo de interação entre o cariolanol e os fosfolídeos também foi avaliada por DSC. Mas apenas nas concentrações de 0,1% e 0,3%, devido ao baixo rendimento da reação, não houve material suficiente para a concentração de 0,5%. Nas Figuras 43 e 44 constam os termogramas para as concentrações de 0,1% e 0,3% dos lipossomas constituídos pelo cariolanol + DMPC.

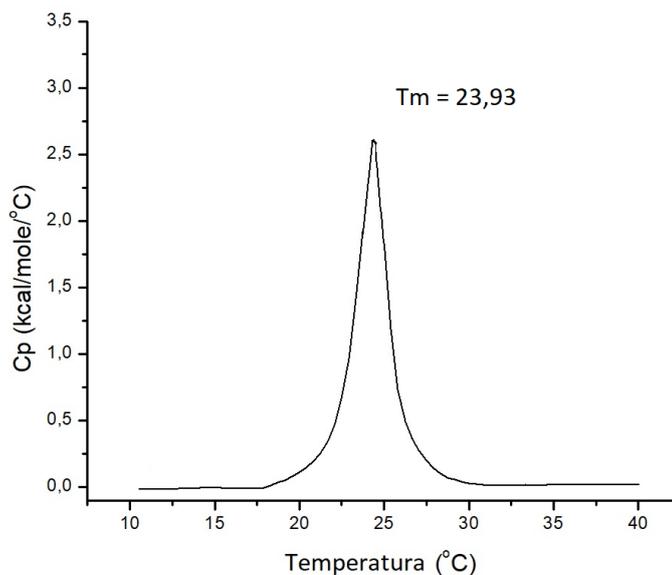


Figura 43. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol na concentração de 0,1%.

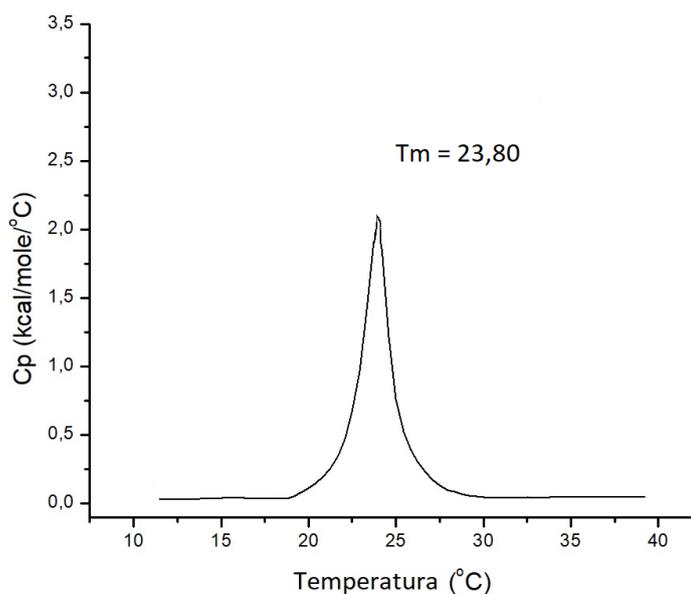


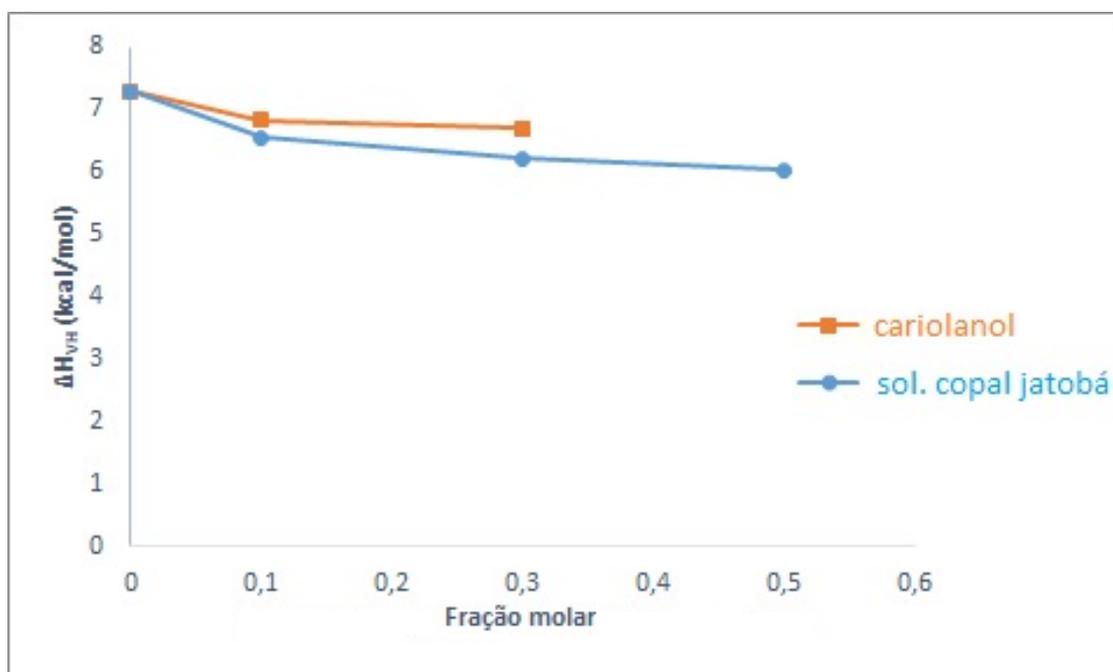
Figura 44. Termograma adquirido por DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol na concentração de 0,3%.

Os dados calorimétricos das análises de DSC do lipossoma modificado com o cariolanol nas concentrações de 0,1% e 0,3% encontram-se na Tabela 7.

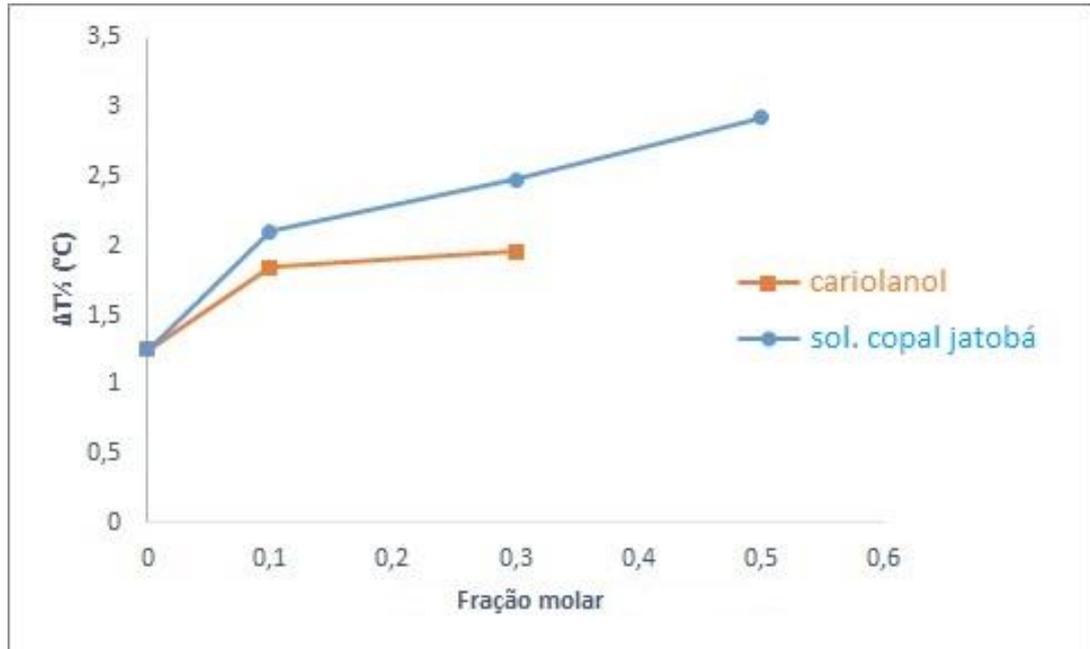
Tabela 7. Compilação dos dados calorimétricos adquiridos por meio de DSC a partir da suspensão de lipossomas constituídos por DMPC + cariolanol em diferentes concentrações.

Amostra	T _m (°C)	ΔH_{cal} (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_{VH} (Kcal/mol)
DMPC + 0,1 %	23,93	5,23	0,218	1,84	6,825
DMPC + 0,3 %	23,80	4,91	0,206	1,96	6,697

Os dados do ΔH_{VH} e $\Delta T_{1/2}$ indicam que este álcool está interferindo menos no grau de cooperatividade dos fosfolipídeos quando comparado com o solubilizado do copal do jatobá (Figuras 45-A e B). Pela estrutura química do cariolanol, pode-se inferir que está havendo uma interação maior desta molécula com a porção polar do fosfolipídeo.



45-A



45-B

Figuras 45-A: Gráfico ilustrando a comparação dos valores de ΔH_{VH} para as frações molares do copal de jatobá e cariolanol. **45-B:** Gráfico ilustrando a comparação dos valores de $\Delta T_{1/2}$ para as frações molares do copal de jatobá e cariolanol.

Além de atuar na proteção e revestimento estrutural das células, as membranas biológicas desempenham um papel muito importante na permeabilidade seletiva e no reconhecimento de íons, moléculas, peptídeos e proteínas (LUCIO et al., 2010).

Historicamente, no desenvolvimento de fármacos, a grande maioria destes compostos tem como principal alvo o reconhecimento das proteínas alojadas na membrana, considerando o restante da estrutura lipídica como uma parte inerte da estrutura. Entretanto esta percepção está sendo alterada devido a novas descobertas que estão evidenciando que os lipídeos são responsáveis pela execução de funções cruciais na célula, o que justifica a presença de diferentes tipos de moléculas desta família nas membranas (KNOBLOCH et al., 2015; LUCIO et al., 2010).

Atualmente já se tem conhecimento que além de funcionar como suporte para o ancoramento de proteínas e na formação de barreiras para delimitação de organelas e da própria célula, os lipídeos participam dos processos que envolvem a interação de proteínas com membranas de outras células e atuam regulando a distribuição e localização de proteínas periféricas nos domínios de membrana (LUCIO et al., 2010).

Neste sentido, avaliar a transição de fase dos lipídeos é um importante aspecto a ser observado no comportamento das membranas biológicas e artificiais, visto que este parâmetro está diretamente associado aos seguintes fatores: transporte mediado por carreadores; atividade enzimática; inserção de proteínas na parede das membranas e a permeabilidade de íons e moléculas (FIDORRA et al., 2009; MARSH et al., 1977).

Assim, muitos lipídeos encontrados em membranas celulares tem seu T_m característico próximo ao regime de temperatura de relevância biológica e nesta faixa de temperatura pode-se avaliar o grau de cooperatividade dos fosfolipídeos durante o processo de transição da fase gel para fase líquido-cristalina (GRABITZ et al., 2002).

6 - CONCLUSÃO

Pelos aspectos microscópicos apresentados pode-se concluir que o copal de jatobá apresenta arranjo nanoestruturado organizado em padrão uniforme na sua estrutura interna e um aspecto macroscópico vítreo e transparente.

Pela análise da constituição e ambiente químicos por meio das técnicas de CG-MS e espectroscopia Raman, respectivamente, foi possível identificar a presença das moléculas de β -cariofileno, humuleno e óxido do β -cariofileno presentes na amostra; assim como foram detectados os picos e bandas correspondentes ao efeito Raman relatados na literatura para amostras com constituição química semelhante.

Os dados de DLS demonstram que o aumento da fração molar do solubilizado do copal do jatobá diminui o diâmetro hidrodinâmico e aumenta o Pdl, indicando que há uma relação concentração dependente.

Os dados calorimétricos forneceram importantes informações sobre o tipo de interação que ocorre no processo de formulação dos lipossomas com o solubilizado do copal do jatobá. Nesta conformação, o β -cariofileno tem maior afinidade pela porção apolar da bicamada do lipossoma.

Para o cariolanol, apesar do processo de síntese não ter apresentado o rendimento reacional esperado e o processo de purificação necessitar de algumas adequações para aumento de rendimento, de acordo com a literatura, observou-se que a execução de um processo de funcionalização (via hidroxilação) da molécula de β -cariofileno é viável de ser executado. Neste caso a avaliação por calorimetria indicou que o incremento na polaridade da molécula está favorecendo a interação do cariolanol com a porção polar do fosfolípido.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAD, A. et al. Chemical penetration enhancers: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 7, p. 969-988, 2009.

ALBON, N.; STURTEVANT, J. M. Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 5, p. 2258-2260, 1978.

ALEXANDRE SCHEFER, F. et al. Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in mice. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 198, p. 262-267, 2017.

APPENDINO, G.; CHIANESE, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Cannabinoids: Occurrence and Medicinal Chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1085-1099, 2011.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438 ISBN 85-7269-240-1.

BARLETTA, E.; WANDEL, K. High resolution UHV-AFM surface analysis on polymeric materials: Baltic Amber. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, n. 5, p. 1473-1478, 2011.

BLOCH, K. The Biological Synthesis of Cholesterol. **Science**, v. 150, n. 3692, p. 19, 1965.

BOZZOLA, J. J. Electron Microscopy. **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**, v. Jul 2001, p. 1-10, 2001.

BRANCO, P. D. M. Âmbar: uma gema com registro de vida. **Serviço Geológico do Brasil - CPRM**, Brasil, p. Rede de Bibliotecas, 2008. Disponível em: < <http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Ambar%3A-uma-gema-com-registro-de-vida-1265.html> >. Acesso em: 10/10/2016.

BRAND, G. D. **Estratégia para prospecção e predição de peptídeos bioativos**. 2007. 219 (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília.

BRUYLANTS, G.; WOUTERS, J.; MICHAUX, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 2011-20, 2005.

CHANG, K.-C. et al. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 24, n. 4, p. 162-169, 2012.

CHICCA, A. et al. Functionalization of β -Caryophyllene Generates Novel Polypharmacology in the Endocannabinoid System. **American Chemical Society (ACS) Chemical Biology**, v. 9, n. 7, p. 1499-1507, 2014.

CHRIMES, A. F. et al. Microfluidics and Raman microscopy: current applications and future challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5880-5906, 2013.

CUNNINGHAM, A. et al. ^{13}C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 965-968, 1983/01/01 1983.

DAVIS, S. S. Coming of age of lipid-based drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1241-1242, 2004.

DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 577-580, 2001.

DEAMER, D. W. From "Banghasomes" to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1308-1310, 2010.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15–16, p. 1621-1637, 2009.

DEWICK, P. M. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: (Ed.). **Medicinal Natural Products**: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p.187-310. ISBN 9780470742761.

DOMÉNECH-CARBÓ, M. T. et al. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, n. 1–3, p. 81-92, 2009.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; VILLAR, S. E. J. Raman microspectroscopic studies of amber resins with insect inclusions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 68, n. 4, p. 1089-1095, 2007.

ERICKSON, B.; NELSON; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176-185, 2012.

FEUCHT, C. L.; PATEL, D. R. Analgesics and anti-inflammatory medications in sports: use and abuse. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, n. 3, p. 751-74, 2010.

FIDORRA, M.; HEIMBURG, T.; SEEGER, H. M. Melting of individual lipid components in binary lipid mixtures studied by FTIR spectroscopy, DSC and Monte Carlo simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 3, p. 600-607, 2009.

FORMISANO, C. et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Onopordum illyricum* L. (Asteraceae), an Italian medicinal plant. **Fitoterapia**, v. 116, p. 61-65, 2017.

FREIRE, E. Differential Scanning Calorimetry. In: SHIRLEY, B. A. (Ed.). **Protein Stability and Folding: Theory and Practice**. Totowa, NJ: Humana Press, 1995. p.191-218. ISBN 978-1-59259-527-3.

FREIRE, E.; BILTONEN, R. Estimation of molecular averages and equilibrium fluctuations in lipid bilayer systems from the excess heat capacity function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 514, n. 1, p. 54-68, Dec 04 1978.

FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M. Isothermal titration calorimetry. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 950A-959A, 1990.

GAO, S. et al. Total sesquiterpene lactones prepared from *Inula helenium* L. has potentials in prevention and therapy of rheumatoid arthritis. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 196, p. 39-46, 2017.

GERTSCH, J. Antiinflammatory cannabinoids in diet – towards a better understanding of CB2 receptor action? **Communicative & Integrative Biology**, v. 1, n. 1, p. 26-28, 2008.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GIGLIARELLI, G. et al. Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp.). **Molecules**, v. 20, n. 12, 2015.

GOLUBEV, Y.; KOVALEVA, O. The structure of the natural fossil resins of North Eurasia according to IR-spectroscopy and microscopic data. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 30, n. 39, p. 247-258, 2012.

GRABITZ, P.; IVANOVA, V. P.; HEIMBURG, T. Relaxation Kinetics of Lipid Membranes and Its Relation to the Heat Capacity. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 1, p. 299-309, 2002.

GRIMALT, J. O. et al. The molecular composition of ambers. **Organic Geochemistry**, v. 13, n. 4, p. 677-690, 1988.

GRUEHN, R. High resolution transmission electron microscopy (HRTEM). **Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 333, n. 7, p. 781-782, 1989.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with Analgesic Activity—A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243-265, 2014.

HOHMANN, M. S. N. et al. Chapter 7 - Sesquiterpene Lactones: Structural Diversity and Perspectives as Anti-Inflammatory Molecules. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v.49, 2016. p.243-264. ISBN 1572-5995.

HONG, S.-S.; KIM, S. H.; LIM, S.-J. Effects of triglycerides on the hydrophobic drug loading capacity of saturated phosphatidylcholine-based liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 142-150, 2015.

HURLEY, J. H. et al. Membrane Budding. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 875-887, 2010.

JALILI, N.; LAXMINARAYANA, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. **Mechatronics**, v. 14, n. 8, p. 907-945, 2004.

JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.

KANEHISA, M. I.; TSONG, T. Y. Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 2, p. 424-432, 1978.

KASZUBA, M. et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 823-829, 2008.

KHOO, S. F.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29, n. 21, p. 3379-3388, 1973.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 335-355, 2009.

KNOBLOCH, J. et al. Membrane-drug interactions studied using model membrane systems. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 6, p. 714-718, 2015.

LAMBERT, J. B.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; ANDERSON, K. B. Chemical Signatures of Fossilized Resins and Recent Plant Exudates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 50, p. 9608-9616, 2008.

LAMBERT, J. B. et al. DISTINGUISHING AMBER AND COPAL CLASSES BY PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. **Archaeometry**, v. 54, n. 2, p. 332-348, 2012.

LANGENHEIM, J. H. Amber: A Botanical Inquiry. **Science**, v. 163, n. 3872, p. 1157-1169, 1969-03-14 00:00:00 1969.

LANGENHEIM, J. H.; BECK, C. W. Infrared Spectra as a Means of Determining Botanical Sources of Amber. **Science**, v. 149, n. 3679, p. 52-4, 1965.

LANGENHEIM, J. H.; LEE, Y.-T. Reinstatement of the Genus *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Africa. **Brittonia**, v. 26, n. 1, p. 3-21, 1974.

LAŠENKO INGA, Ļ.; GAIDUKOVŠ, S.; ROMBOVSKA, J. Manufacturing of amber particles suitable for composite fibre melt spinning. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences**. 70: 51. 2016.

LI, Y.-S.; CHURCH, J. S. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 29-48, 2014.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, n. Supplement C, p. 965-987, 2016.

LIU, C. et al. A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer β -Cyclodextrin: A Novel Anti-Inflammation Agent with Low Toxicity. **Public Library of Science - PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101761, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: 2002. 352 ISBN 85-86714-14-3.

LUCIO, M.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 1795-1809, 2010.

LUKYANOV, A. N.; TORCHILIN, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1273-1289, 2004.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 396, 2007.

MARSH, D.; WATTS, A.; KNOWLES, P. F. Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 465, n. 3, p. 500-514, 1977.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H.; ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 10, p. 3049-3051, 1972.

MARTÍNEZ-RICHA, A. et al. A solid-state ^{13}C NMR analysis of ambers. **Polymer**, v. 41, n. 2, p. 743-750, 2000.

MILLS, J. S.; WHITE, R.; GOUGH, L. J. The chemical composition of Baltic amber. **Chemical Geology**, v. 47, n. 1, p. 15-39, 1984.

MITIĆ, Z. S. et al. Terpenes as Useful Markers in Differentiation of Natural Populations of Relict Pines *Pinus heldreichii*, *P. nigra*, and *P. peuce*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 8, 2017.

MOHAMED, A. E. et al. Anti-inflammatory activity of highly oxygenated terpenoids from *Achillea biebersteinii* Afan. **Zeitschrift für Naturforsch C**, v. 71, n. 11-12, p. 429-432, 2016.

PAULA-FREIRE, L. I. G. et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

PENG, S. et al. Hybrid liposomes composed of amphiphilic chitosan and phospholipid: Preparation, stability and bioavailability as a carrier for curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 322-332, 2017.

PHILLIPS, R. et al. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 379-385, 2009.

PICKENS, L. B.; TANG, Y.; CHOOI, Y.-H. Metabolic Engineering for the Production of Natural Products. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 211-236, 2011.

RANGSIMAWONG, W. et al. Terpene-containing PEGylated liposomes as transdermal carriers of a hydrophilic compound. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. advpub, 2014.

REICHEL, R. Scanning Electron Microscopy. In: HAWKES, P. W. e SPENCE, J. C. H. (Ed.). **Science of Microscopy**. New York, NY: Springer New York, 2007. p.133-272. ISBN 978-0-387-49762-4.

RODRIGUEZ-CHAVEZ, J. L. et al. Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 195, p. 39-63, 2017.

ROMERO-ESTRADA, A. et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, 2016.

ROSSI, T. Identificação de Espécies Florestais. Brasil, 22/01/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ipef.br/identificacao/hymenaea.courbaril.asp> >. Acesso em: 10/10/2016.

SALIM, N. N.; FEIG, A. L. Isothermal titration calorimetry of RNA. **Methods**, v. 47, n. 3, p. 198-205, 2009.

SARPIETRO, M. G. et al. Interaction of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochimica Acta**, v. 600, p. 28-34, 2015.

SCHLUCKER, S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 53, n. 19, p. 4756-95, 2014.

SCHWAB, W.; FUCHS, C.; HUANG, F.-C. Transformation of terpenes into fine chemicals. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 1, p. 3-8, 2013.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

SOUZA, I. M.; FUNCH, L. S.; DE QUEIROZ, L. P. Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **PhytoKeys**, n. 38, p. 101-118, 2014.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

STEVENS, R. Dictionary of terpenoids, J. D. Connolly and R. A. Hill, Chapman & Hall, London, 1991. Three volumes containing 2156 pages, price £985.00. ISBN 0-412-25770-X. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, n. 4, p. 242-243, 1992.

STEWART, J. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 10-4, 1980.

TAN, C. et al. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 774-784, 2016.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 813-827, 2014.

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5-8, 2011.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008.

VAN OSDOL, W. W. et al. Relaxation dynamics of the gel to liquid-crystalline transition of phosphatidylcholine bilayers. Effects of chainlength and vesicle size. **Biophysical Journal**, v. 59, n. 4, p. 775-785, 1991.

VÁVRA, N. The Chemistry of Amber - Facts, Findings and Opinions. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, v. 111A p. 445 - 474, 2009.

VELÁZQUEZ-CAMPOY, A. et al. Isothermal Titration Calorimetry. In: (Ed.). **Current Protocols in Cell Biology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471143031.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R. R. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. In: ZHANG, L. e DEMAIN, A. L. (Ed.). **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p.197-227. ISBN 978-1-59259-976-9.

WANG, Y. et al. Inhibition of influenza virus via a sesquiterpene fraction isolated from *Laggera pterodonta* by targeting the NF-kappaB and p38 pathways. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 25, 2017.

WATSON, H. Biological membranes. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 43-69, 2015.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. The Transmission Electron Microscope. In: (Ed.). **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**. Boston, MA: Springer US, 1996. p.3-17. ISBN 978-1-4757-2519-3.

XING, Y. et al. Sesquiterpene Coumarins from *Ferula sinkiangensis* Act as Neuroinflammation Inhibitors. **Planta Medica**, v. 83, n. 1-02, p. 135-142, 2017.

YANG, P.; WANG, L.; XIE, X.-Q. Latest advances in novel cannabinoid CB2 ligands for drug abuse and their therapeutic potential. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187-204, 2012.

YOSHIHARA, A.; MAEDA, T.; IMAI, Y. Spectroscopic characterization of ambers and amber-like materials. **Vibrational Spectroscopy**, v. 50, n. 2, p. 250-256, 2009.

ZULAK, K. G.; BOHLMANN, J. Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 86-97, 2010.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.

8 - ANEXOS

ANEXO I



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas
Coordenação de Geração de Conhecimento dos Recursos Faunísticos e Pesqueiros
SCEN Trecho 2 Ed. Sede do Ibama - Cx. Postal nº 09566 Brasília - DF
CEP: 70818-900 e (61) 3316-1475
www.ibama.gov.br

OF 02001.001407/2015-64 COCFP/IBAMA

Brasília, 06 de fevereiro de 2015.

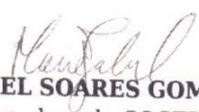
Ao Senhor
Fábio Silva Macedo
Coordenador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Parque Estação Biológica-PqEB W3 Norte - Ed. Sede - Caixa Postal 08815
BRASILIA - DISTRITO FEDERAL
CEP.: 70770901

Assunto: **Acesso ao patrimônio genético**

Senhor Coordenador,

1. Informamos que o projeto de pesquisa *"Síntese e caracterização de micro e nano partículas obtidas a partir de rotas de química verde com uso plantas, fungos, leveduras, bactérias e archaea"*, coordenado pelo pesquisador Luciano Paulino da Silva, processo nº 02001.007580/2014-95, foi incluído no portfólio da Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético da Embrapa.
2. Conforme o Decreto nº 3.945/2001 a instituição beneficiada pela autorização de acesso ao patrimônio genético deverá enviar relatórios de atividades cuja periodicidade não poderá exceder o prazo de doze meses.

Atenciosamente,


MARIA IZABEL SOARES GOMES DA SILVA
Coordenadora da COCFP/IBAMA