

Atividade Biológica de Alguns Ácidos Diterpênicos Naturais e de seus Derivados Semi-Sintéticos

Biological Activity of Some Diterpenic Acids and its Semi-Synthetic Derivatives

¹Giacomini, R. A.; ²Santos, C.; ³Nogueira R. T.; ⁴Carvalho J. E.; ⁵Lunardi, I.; ⁵Soriano, M. P. del C.; ⁵Ide R. M.; ^{5*}Imamura, P. M.

¹Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ; ²UNIMAR, Universidade de Marília, Marília, SP; ³Instituto de Química, USP, Ribeirão Preto, SP; ⁴Centro de Pesquisa CPQBA-UNICAMP; ⁵Instituto de Química, C. P. 6154, UNICAMP, 13084-971, Campinas, SP.

*Correspondência: Email: imam@iqm.unicamp.br

Unitermos:

Leguminosae; diterpeno; bioensaio; *Artemia salina*; bioautografia, semi-síntese.

Key-words:

Leguminosae; diterpene; bioassay; *Artemia salina*; bioautography, semi-synthesis.

Resumo

Neste trabalho estão relatados os resultados complementares obtidos de bioensaios realizados com os ácidos diterpênicos naturais (-)-ácido ózico (**1a**), (-)-ácido abiético (**2a**), (\pm)-ácido copálico (**3a**) e (+)-ácido hardwickiico (**4a**), e de seus derivados semi-sintéticos. O composto **1a** foi isolado do epicarpo de *Hymenaea* sp. (coletada em Campinas, SP); o ácido abiético (**2a**) foi isolado da resina comercial de *Pinus elliottii*, e os demais da resina comercial de *Copaifera* sp. Em uma primeira etapa foram realizados ensaios de letalidade com *Artemia salina* e de bioautografia. Os compostos que apresentaram os melhores resultados na primeira etapa foram bioensaiados em testes específicos de inibição de crescimento de células carcinogênicas e do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

This work presents bioassays complementary results obtained from some natural diterpenes as (-)-ozic acid (**1a**), (-)-abietic acid (**2a**), (\pm)-copalic acid (**3a**) and (+)-hardwickic acid (**4a**), and some of their semi-synthetic derivatives. Compound **1a** was isolated from the epicarp resin of *Hymenaea* sp. (collected in Campinas, SP); (-)-Abietic acid (**2a**) was obtained from commercial resin of *Pinus elliottii*, and copalic and hardwickic acids (**3a** and **4a**) were isolated from commercial resin of *Copaifera* sp. In a first approach, brine shrimp (*Artemia salina*) mortality and bioautographic assays were carried out. The compounds, which presented the better results in these former tests, were submitted to assays for their inhibitory ability on carcinogenic cells and *Mycobacterium tuberculosis* bacillus growth.

Introdução

Mesmo reconhecendo o inestimável valor da pesquisa fitoquímica *per se*, que se caracteriza por isolar, identificar e divulgar novas substâncias naturais, é sempre interessante associar estas informações a estudos de investigação das atividades biológicas através de bioensaios



(McLAUGHLIN, 1995). Desde os primórdios da história da humanidade há relatos mostrando que o homem sempre utilizou plantas na cura de doenças. Entretanto, foi apenas no início do século XIX que Sertürner isolou a morfina do ópio, sendo este considerado o primeiro composto bioativo (PARTINGTON, 1989). A partir deste fato, cresceu consideravelmente o interesse no isolamento de novos compostos naturais apresentando bioatividades e, nos últimos anos, com o advento e a sofisticação de técnicas analíticas como CLAE, RMN bidimensional e outras, o isolamento e a elucidação estrutural de novas substâncias, mesmo complexas, tornou-se trivial.

Dentre as diversas classes de produtos naturais, os terpenos oferecem uma diversidade muito grande de metabólitos secundários com ampla variedade de estruturas e bioatividades (HANSON, 1995 e 2001). Por esta razão, constitui-se em uma classe de grande interesse fitoquímico, o que motivou nosso laboratório a investigar os óleos resinosos de plantas pertencentes à família Leguminosae, como a Copaíba (*Copaifera* sp.) e o Jatobá (*Hymenaea* sp.). Estas plantas, da subfamília Caesalpinoideae e tribo Detarieae, estão amplamente difundidas no território brasileiro, principalmente nas Regiões Sudeste, Norte e Nordeste (LANGENHEIM 1973 e 1975). Estas resinas são soluções naturais de ácidos diterpênicos em um óleo essencial constituído predominantemente por sesquiterpenos. Estas plantas já foram objetos de estudos de alguns grupos de pesquisa (PINTO, 2002); entretanto, poucos resultados têm sido divulgados com relação a bioatividade dos compostos isolados.

Além da investigação de bioatividade de terpenos naturais, a semi-síntese de substâncias inéditas ou mais raras pode ser um caminho para descobrir e desenvolver potenciais fármacos, a partir de terpenos que sejam abundantes, e que apresentem características estruturais e funcionais apropriadas. Nesse aspecto, a ferramenta sintética aplicada à pesquisa fitoquímica é uma associação importante para auxiliar a descoberta de novos fármacos. Em muitas ocasiões, os produtos naturais se mostram inativos, muito tóxicos ou ainda com bioatividades indesejadas. Em alguns casos é possível, através de transformações químicas, potencializar a atividade farmacológica esperada e/ou reduzir outras que estão relacionadas à toxicidade do composto (HOSTETTMANN, 1993).

Em sua imensa diversidade estrutural, alguns terpenos de origem marinha (YAMADA, 1992; SHIN, 1997) têm se tornado alvo sintético em nosso laboratório. Este interesse foi motivado por trabalhos realizados nas últimas décadas, destacando estes compostos como uma rica fonte de novos metabólitos secundários, com diversas atividades biológicas, tais como: antibióticas, antitumorais e antivirais (BHAKUNI, 1998). Outros fatores que têm estimulado a síntese total destes compostos são a elucidação de configurações absolutas (CREWS, 1985) e a preparação de análogos, com a finalidade de avaliar a variação da bioatividade, quando comparada ao do produto natural (GIACOMINI, 2002).

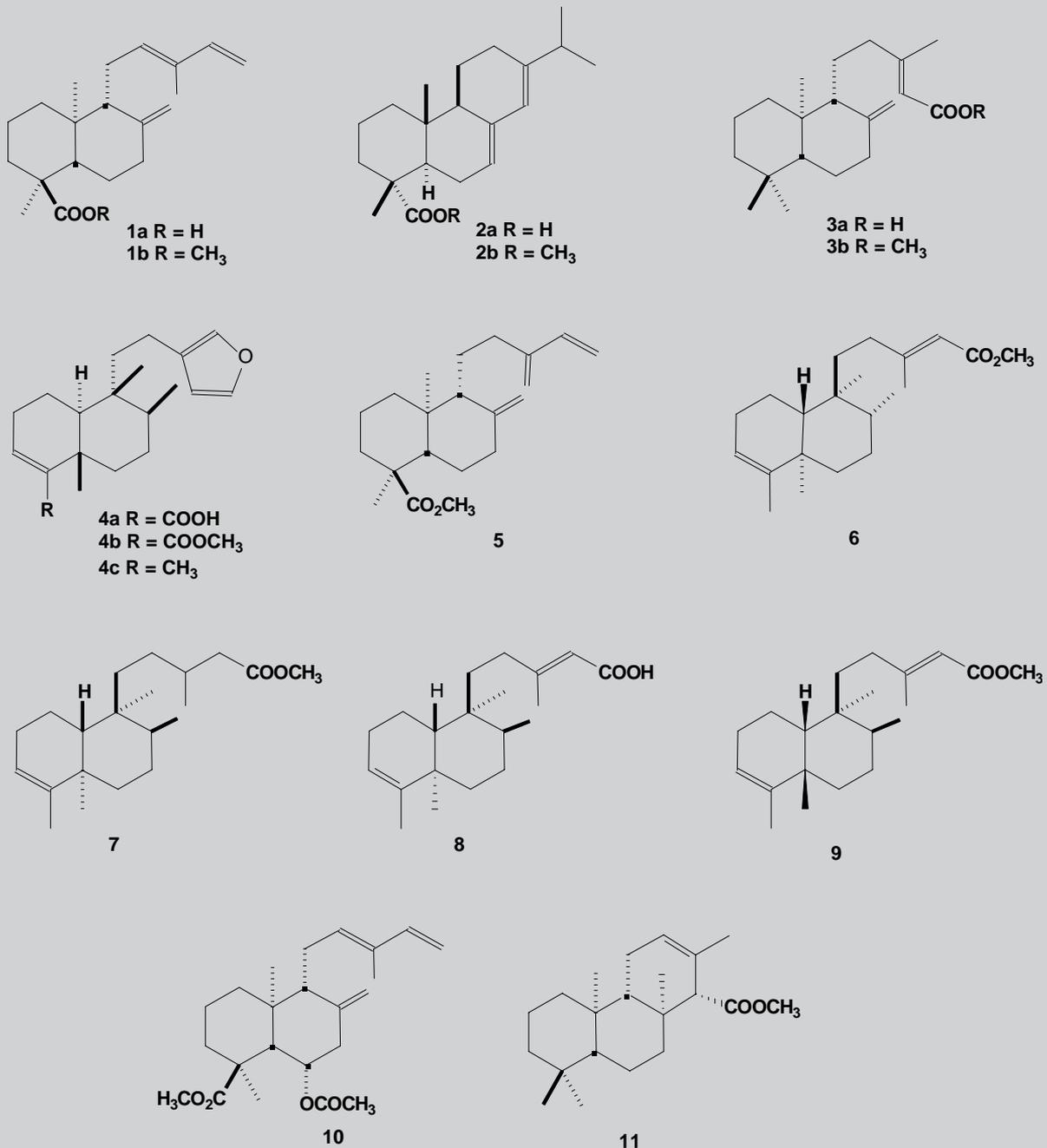
Outra classe de diterpenos que tem despertado o nosso interesse apresenta a unidade hidroxibutenolida, e pertence à série clerodano (IMAMURA, 1999). Compostos com estas características são encontrados com frequência em plantas do gênero *Polyalthia* (RASHID, 1996), *Acritopappus*, (BOHLMANN, 1980) *Premna* (HABTEMARIAM, 1992) e *Cyathocalyx* (WIJERATHNE, 1994); sendo que muitas delas são amplamente utilizadas na medicina popular como diuréticos (HASAN, 1995) e antipiréticos (CHAKRABARTY, 1992). Além disso, alguns clerodanos hidroxibutenolidos têm demonstrado atividades bastante significativas, como anti-alimentares (PHADNIS, 1988) antimicrobianas (HAO, 1995) e citotóxicas (McLAUGHLIN, 1991). Durante vários anos de trabalho, diversos ácidos diterpênicos foram isolados de plantas da Família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e tribo Detarieae. Em muitos casos, plantas desta classe botânica são grandes produtoras de resinas ricas em sesqui- e diterpenos, constituindo-se em uma fonte importante de matéria-prima de interesse comercial (LANGENHEIM, 1975).

Os compostos foram obtidos, na sua maioria, na forma de ésteres metílicos (Figura 1) como o ozato (**1b**), isoozato (**5**), kolavenato (**6**), os isômeros **7**, **8** e **9**, zanzibarato (**10**), copalato (**3b**), isocopalato (**11**), hardwickato (**4b**), etc., (NOGUEIRA, 1999; GIACOMINI, 2002, LUNARDI, 2002). O (-)-ácido ózico (**1a**) (do gênero *Hymenaea* sp.), os ácidos hardwickiico (**4a**) e copálico (**3a**) (do gênero *Copaifera* sp.) foram encontrados abundantemente nestas espécies e, por esta razão, foram utilizados como fonte de matéria-prima para sintetizar outros compostos inéditos ou raros. O ácido abiético (**2a**), encontrado como composto majoritário na resina de

P. elliotii (Família Pinaceae) também foi utilizado como material de partida em sínteses (SANTOS, 2001). Alguns dos compostos sintetizados têm origem marinha como o sesterterpeno hyrtiosal (**5**) (LUNARDI, 2002) e análogos a um norsesquiterpeno diacetilado isolado de esponja marinha (SHIN, 1997). Além destes, também foram sintetizados clerodanos

contendo unidades hidroxibutenolida que mostraram ser muito ativos no teste de letalidade contra *Artemia salina* (IDE, 2003). Vários outros compostos com estruturas inéditas e interessantes foram também obtidos a partir do ácido abiético (**2**) (SANTOS, 2001; SORIANO, 2004).

Figura 1 – Estruturas dos compostos isolados da *Hymenaea* sp., *Copaifera* sp. e *Pinus elliotii*.





Materiais e Métodos

Todos os compostos isolados e sintetizados foram submetidos a bioensaios simples, como a medida de letalidade com *Artemia salina* e a bioautografia. Alguns, que se mostraram bastante ativos e que foram preparados em quantidade, foram encaminhados para a realização de testes *in vitro* contra a *M. tuberculosis* e testes de inibição de crescimento (IC50) e de letalidade (LC50), contra diversas linhagens de células tumorais (SANTOS 2001, LUNARDI 2002).

Teste de letalidade contra *Artemia salina*. O método utiliza camarão de água salgada para determinar LC50 (g/mL). Valores de LC50 1000 são considerados ativos para extratos e 30 muito ativos para substâncias puras. O protocolo foi descrito por McLaughlin e colaboradores (1982).

Teste de atividade bactericida e fungicida (bioautografia). Este método utiliza placas cromatográficas para investigar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e de substâncias puras (SAXENA, 1995). Nas placas cromatográficas a serem inoculadas, foram aplicados 2 L do antibiótico ou do antifúngico, conforme o caso, e 10 L do composto a ser avaliado. Após a eluição dos compostos sob avaliação sobre uma placa cromatográfica, esta foi colocada dentro de uma placa de Petri e sobre ela foi adicionado um meio de cultura adequado. Após a solidificação do meio de cultura, foram inoculados bactérias e fungos na forma de suspensão (100 a 200 L), contendo aproximadamente 106 células/mL. O antibiótico de controle utilizado foi o cloranfenicol (5 mg/mL) e o fungicida utilizado foi o ciclopiroxolamina (10 mg/mL). As amostras foram preparadas na concentração de 2 mg/mL, e as placas foram incubadas na temperatura e tempo adequado para cada microorganismo (24h a 37 °C para bactérias e 7 dias a 28 °C para fungos). A atividade biológica apresenta resultado positivo quando se observa na placa cromatográfica um halo de inibição de crescimento do microorganismo sobre a substância investigada. Os microorganismos e os meios de cultura foram fornecidos pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. As bactérias utilizadas foram: *Bacillus subtilis* (CCT 0089, Gram positiva), *Staphylococcus aureus* (CCT 4295, Gram positiva), *Salmonella typhimurum* (CCT 1978, Gram negativa), *Rhodococcus equi* (CCT 0541, Gram positiva) e

Escherichia coli (CCT 1457, Gram negativa). Os fungos utilizados foram: *Aspergillus niger* (CCT 1435), *Penicillium funiculosum* (CCT 0490), *Fusarium oxysporium* (CCT 3244), *Rhizopus orizae* (CCT 4964), *Aspergillus fumigatus* (CCT 1277), *Alternaria alternata* (CCT 1250) e *Cladosporium cladosporioides* (CCT 5039).

Teste *in vitro* de atividade antiproliferativa (antitumoral). Os ensaios foram realizados com diversas linhagens de células tumorais humanas, como: leucemia (K-562), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), cólon (HT-29), rim (786), ovário (OVCAR), mama (MCF-7), mama resistente (NCI ADR) e próstata (PC-03). Os bioensaios foram realizados no Instituto Nacional de Câncer (NCI, EUA) e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, Campinas, SP), utilizando o protocolo e as linhagens de células cedidas pelo NCI (LUNARDI 2002; SANTOS, 2001).

Teste *in vitro* contra o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Este teste foi realizado segundo protocolo do TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility - Southern Research Institute) (SANTOS, 2001).

Resultados e Discussão

Do extrato hexânico do epicarpo de *H. courbaril* var. altíssima, foram isolados, após tratamento com diazometano, quatro ésteres diterpênicos conhecidos 1b, 5, 6 e 10. Dentre estes foi identificado o kolavenato de metila (6) contendo esqueleto clerodano e que apresentou valor de $[\alpha]_D^{25}$ -58 (c 0,7, CHCl₃) (HARA et. al., 1995). Os demais compostos apresentaram esqueleto do tipo labdano e foram caracterizados como ozato de metila (1b), $[\alpha]_D^{25}$ -30,6 (c 2,5, CHCl₃), (STIPANOVIC, 1979), isoozato de metila (5) $[\alpha]_D^{25}$ -23 (c 1,2, CHCl₃), (KHOO, 1973), e o zanzibarato de metila (10) $[\alpha]_D^{25}$ -37,5 (c 2,0, CHCl₃), (OURISSON, 1965 e GIACOMINI, 2004). O extrato de acetato de etila da casca do tronco forneceu, entre outros compostos conhecidos, após esterificação com diazometano, um novo diterpeno contendo esqueleto clerodano (7), que apresentou valor de rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25}$ -54,0 (c 0,6, CHCl₃) (IMAMURA, 2002a). Do extrato obtido com acetato de etila do epicarpo de *H. courbaril* var. stilbocarpa foram isolados, além do ozato, isoozato e kolavenato de metila, dois novos clerodanos isômeros do ácido

kolavênico, 8 e 9. O ácido 8 foi obtido na forma de cristal com rotação óptica específica $[\alpha]_D -61,0$ (c 0,4, CHCl_3) e o composto 9, como na maioria dos casos, foi obtido como o derivado éster metílico, apresentando $[\alpha]_D -65$ (c 1,1, CHCl_3) (IMAMURA, 2001). Da resina comercial de *Copaifera sp.* foram isolados, na forma de ésteres metílicos, três diterpenos: o copalato de metila (3b) $\{[\alpha]_D -37,5$ (c 2,0, $\text{CHCl}_3\}$, contendo o esqueleto labdano, o isocopalato de metila (11) $\{[\alpha]_D -37,5$ (c 2,0, $\text{CHCl}_3\}$; e o terceiro o hardwickato de metila (4b), com esqueleto clerodano e $[\alpha]_D -37,5$ (c 2,0, CHCl_3) (LUNARDI, 2002; IDE, 2003). O abietato de metila (2b) com esqueleto abietano $[\alpha]_D -37,5$ (c 2,0, CHCl_3) foi obtido da resina comercial de *P. elliotii* (IKAN, 1991; SANTOS, 2000). Os resultados dos ensaios com *Artemia salina* e bioautografia com bactérias para estes compostos que se apresentaram ativos (Figura 1) estão descritos na Tabela 1. Todos os compostos se mostraram inativos contra fungos.

Tabela 1 - Resultados dos ensaios de letalidade contra *Artemia salina* e bioautografia com bactérias com os produtos naturais isolados

Composto	<i>Artemia salina</i> (IC ₅₀ - mg/mL)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rodococcus equi</i>
1b	-	+	+	+
3b	-	+	+	+
4b	41,0	-	-	-
6	n.r.	+	+	+
7	n.r.	+	-	+
8	n.r.	+	+	+
9	n.r.	+	+	+

n.r. = Teste não realizado; (+) = ativo; (-) = inativo

Os ésteres (-)-ozato de metila (1b), (±)-copalato de metila (2b), (+)-hardwickato de metila (4b) e (-)-abietato de metila (2b) foram utilizados para a síntese de diversos produtos naturais, análogos e derivados (Figura 2) de acordo com a descrição nos respectivos protocolos sintéticos. A partir do copalato de metila foram obtidos o hyrtiosal (12), o enantiômero (13) e o composto 14 (IMAMURA, 2002b); e a partir do ozato de metila (1b) foram obtidos três análogos (15, 16 e 17) ao norsesquiterpeno marinho com esqueleto do tipo drimano (GIACOMINI, 2002). O hardwickato de metila (4b) forneceu dois compostos com esqueletos do tipo clerodano 18 e 19 e outros derivados sintéticos 20-22 (IDE, 2003). Através do abietato de metila (2b) foi possível obter os compostos 23-26 (SANTOS, 2001; SORIANO 2004).

Os resultados dos ensaios preliminares com os produtos sintetizados que se apresentaram ativos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados dos ensaios de letalidade contra *Artemia salina* e bioautografia com os produtos sintetizados.

Composto	<i>Artemia salina</i> (IC ₅₀ - mg/mL)	Bactérias	Fungos
14	24,7	-	-
15	18,5	-	-
16	21,5	-	-
17	16,7	-	-
20	< 0,3	n.r.	n.r.
21	0,6	n.r.	n.r.
22	1,1	n.r.	n.r.
23	21,4	-	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
24	7,2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
25	9,7	-	-
26	25,8	n.r.	n.r.

n.r. = Teste não realizado; (-) = inativo

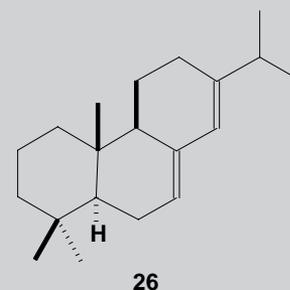
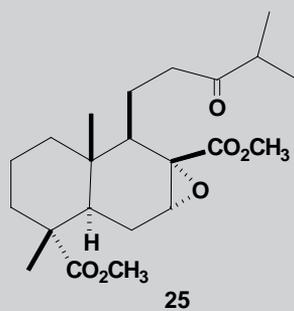
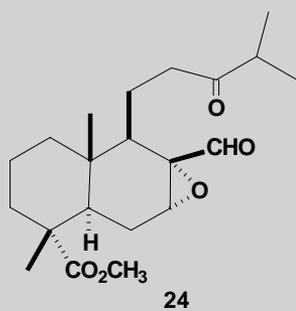
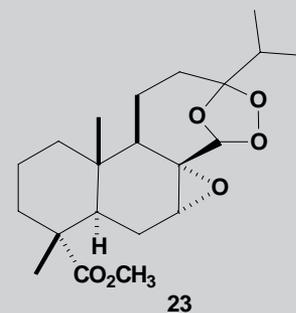
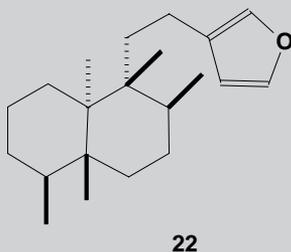
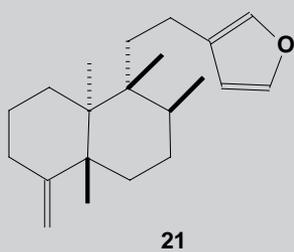
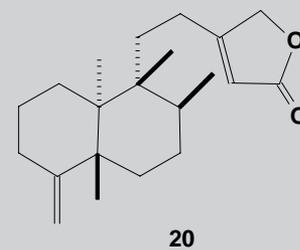
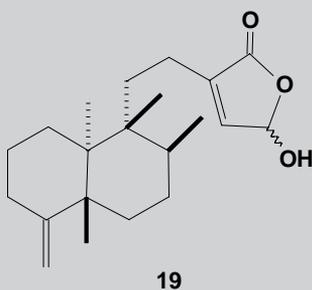
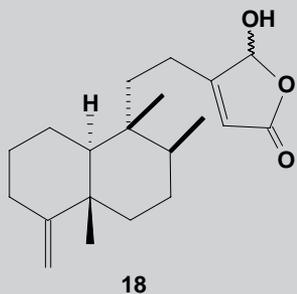
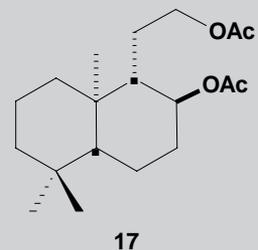
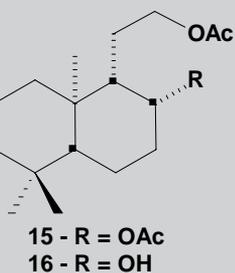
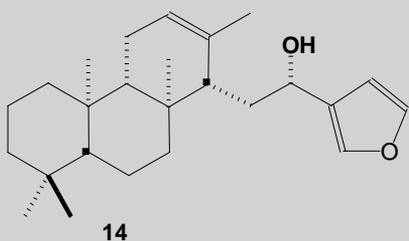
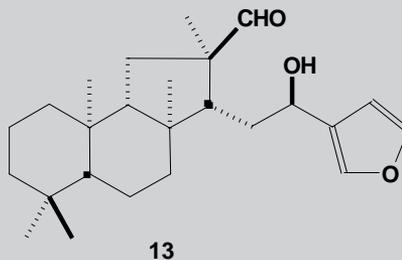
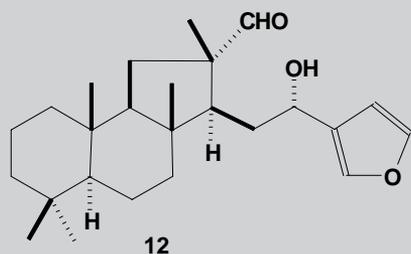
Nos ensaios *in vitro* de atividade anticancerígena, os compostos 12, 13 e 23 mostraram atividade anti-proliferativa significativa contra células tumorais, como melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), rim (786), ovário (OVCAR), mama (MCF-7), mama resistente (NCI ADR), próstata (PC-03) e leucemia (K-562), exceto este último para 23, na concentração de LC₅₀ = 25 mg/mL; e atividade apenas moderada de inibição (IC₅₀ = 250 µg/mL) contra células tumorais do cólon (HT-29). O composto 24 mostrou atividade apenas moderada contra todas as linhagens de células cancerígenas.

Finalmente, o teste *in vitro* contra o bacilo *M. tuberculosis* realizado com os compostos 23 e 24, apenas o primeiro produziu inibição de 21% em relação aos controles do TAACF, valor este insuficiente para que pudesse dar continuidade aos ensaios subseqüentes.

Agradecimentos

À FAPESP pelo suporte financeiro e pelas bolsas de mestrado (R.M.I.) e de doutorado (I.L.; R.A.G.; M.P.C.S), e ao CNPq pelas bolsas de doutorado (R.T.N.; C.S).

Figura 2 – Estruturas dos compostos 12-26 sintetizados a partir dos ácidos diterpênicos isolados de *Hymenaea* sp., *Copaifera* sp. e *Pinus elliottii*.



Referências

1. BHAKUNI, D.S. Some aspects of bioactive marine natural products. *Journal of the Indian Chemical Society*, v.75, n.4, 191-205, 1998.
2. BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Diterpenes and Tetraterpenes from *Acritopappus* species. *Phytochemistry*, v.19, n.12, p.2695-2705, 1980.
3. CHAKRABARTY, M.; NATH, A.C.A. New Clerodane-type Butenolide Diterpene from the Bark of *Polyalthia longifolia*. *Journal of Natural Products*, v.55, n.2, p.256-258, 1992.
4. CREWS, P.; NAYLOR, S. Sesterterpenes: An emerging group of the metabolites from marine and terrestrial organisms. *Fortschritte der Chimie Organischer Naturstoffe*, v.48, p.203-269, 1985.
5. GIACOMINI, R.A. *Estudo fitoquímico do epicarpo de Hymenaea courbaril var. altissima. Síntese de derivados odoríferos do tipo âmbar-gris e sesquiterpenos da classe drimano a partir do (-)-ácido ózico*. Campinas, 320p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP, 2002.
6. GIACOMINI, R.A.; MIRANDA, P.C.M.L.; IMAMURA, P.M. A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for the diterpene methyl (-)-zanzibarate by 2D spectroscopy and NOE experiments, *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.42, n.6, p.561-563, 2004.
7. HABTEMARIAM, S.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Antibacterial Diterpenes from the Aerial Parts of *Premna oligotricha*. *Planta Medica*, v.58, n.1, p.109-110, 1992.
8. HANSON, J.R. Diterpenoids. *Natural Product Reports*, v.12, n.2, p.207-218, 1995.
9. HANSON, J.R. Diterpenoids. *Natural Product Reports*, v.18, n.1, p.88-94, 2001.
10. HAO, X.-J.; YANG, X.-S.; ZHANG, Z.; SHANG, L.-J. Clerodane Diterpenes from *Polyalthia cheliensis*. *Phytochemistry*, v.39, n.2, p.447-448, 1995.
11. HARA, N.; ASAKI, Y.; FUJIMOTO, Y.; GUPTA, Y.K.; SINGH, A.K.; SAHAI, M. Clerodane and ent-halimane diterpenes from *Polyalthia longifolia*. *Phytochemistry*, v.38, n.1, p.189-194, 1995.
12. HASAN, C.M.; ISLAM, M.O.; RASHID, M.A. Clerodane Diterpene from *Polyalthia longifolia* var. *pendulla*. *Pharmazie*, v.50, p.227-228, 1995.
13. HOSTETTMANN, K.; HAMBURGER, M. Search for new lead compounds of natural origin. In: TESTA, B.; KYBURZ, E.; FUHRER, W.; GIGER, R. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1^o ed, Weinheim: VCH, p.475-488, 1993.
14. HUGEL, G.; OURISSON, G. Diterpenes of *Trachylobium*. Structure et stéréochimie de l'acide zanzibarique. *Bulletin de la Société Chimie de France*, n.10, p.2903-2908, 1965.
15. IDE, R.M. *Síntese de clerodanos contendo unidade hidroxibutenolida a partir do (+)-ácido hardwickiico*. Campinas, 145p. Tese (Mestrado), Instituto de Química, UNICAMP, 2003.
16. IKAN, R. *Natural Products: A Laboratory Guide*, San Diego: Academic Press, p.209, 1991.
17. IMAMURA, P.M.; COSTA, M.; TANAKA, C.M.A.; MARSIAOLI, A.J. Isolation and Synthesis of a New Clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, v.50, n.1, p.117-121, 1999.
18. IMAMURA, P.M.; NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE JR, A.; MARSIAOLI, A.J. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry*, v.58, n.8, p.1153-1157, 2001.
19. IMAMURA, P.M.; NOGUEIRA, R.T.; GIACOMINI, R.A.; SHEPHERD, G.J. A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.13, n.3, p.389-391, 2002a.
20. IMAMURA, P.M.; LUNARDI, I.; SANTIAGO, G.M.P. Synthesis of (-) and (+)-hyrtiosal and their C-16 epimers. *Tetrahedron Letters*, v.43, n.19, p.3609-3611, 2002b.
21. IMAMURA, P.M.; SANTOS, C.; ZUKERMAN-J. S. Chemical Transformations of Abietic Acid to new chiral derivatives. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.14, n.6, p.998-1004, 2003.
22. 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.
23. LANGENHEIM, J.H.; CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S. Resin acids from two Amazonian species of *Hymenaea*. *Phytochemistry*, v.12, n.3, p.633-635, 1973.
24. LANGENHEIM, J.H.; LEE, Y.T. *Systematics of the genus Hymenaea L.* Chemistry of California Press Ltd.: Los Angeles, v.69, 1975.
25. LUNARDI, I. *Síntese do sesterterpeno hyrtiosal a partir do ácido copálico. Determinação da configuração absoluta do produto natural*. Campinas, 265p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP, 2002.
26. McLAUGHLIN, J.L.; MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v.45, n.1, p.31-34, 1982.
27. McLAUGHLIN, J.L.; ZHAO, G.; JUNG, J.H.; SMITH, D.L.; WOOD, K.V. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Polyalthia longifolia*. *Planta Medica*, v.57, n.4, p.380-383, 1991.
28. McLAUGHLIN, J.L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, v.18, n.1, p.13-18, 1995.
29. NOGUEIRA, R.T. *Estudo fitoquímico da Hymenaea courbaril var. stilbocarpa e Hymenaea courbaril var. altissima. Cultura de tecidos da Hymenaea courbaril var. stilbocarpa*. Campinas, 363p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP, 1999.
30. PARTINGTON, J.R. A short history of chemistry, New York: Dover Publications, p.220, 1989.
31. PHADNIS, A.P.; PATWARDHAN, S.A.; DHANESHWAR, N.N.; TAVALE, S.S.; ROW, T.N.G. Clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia*. *Phytochemistry*, v.27, n.9, p.2899-2901, 1988.
32. PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.J. O gênero *Copaifera* L. *Quimica Nova*, v.25, n.2, p.273-286, 2002.
33. RASHID, M.A.; HOSSAIN, M.A.; HASAN, C.M.; REZA, M.S. Antimicrobial Diterpenes from *Polyalthia longifolia* var. *pendulla*. *Phytotherapy Research*, v.10, n.1, p.79-81, 1996.
34. SANTOS, C. *Ácido abiético como sinton quiral em estudo de rotas exploratórias visando a síntese de produtos naturais e avaliação de atividade biológica*. Campinas, 281p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP, 2001.
35. SAXENA, G.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.N.; HANCOCK, R. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant-extracts using a thin-layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical Analysis*, v.6, n.3, p.125-127, 1995.
36. SHIN, J.; PAUL, V.J.; SEO, Y.; CHO, K.W.; RHO, J.-R.; BERGQUIST, P.R. Sesquiterpenoids of the Drimane Class from a Sponge of the Genus *Dysidea*. *Journal of Natural Products*, v.60, n.11, p.1115-1120, 1997.
37. SORIANO, M.P.C. *Rotas exploratórias visando a síntese do eperuol a partir dos ácidos abiético e copálico*. Campinas, 217p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP, 2004.
38. STIPANOVIC, R.D.; O'BRIEN, D.H.; ROGERS, C.E.; THOMPSON, T.E. Diterpenoid acids, (-)-cis and (-)-trans-ozic acid, in wild sunflower *Helianthus occidentalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.27, n.2, p.458-459, 1979.
39. WIJERATHNE, E.M.K.; SILVA, L.B.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. Clerodane diterpenoids from *Cyathocalyx zeylanica*. *Phytochemistry*, v.39, n.2, p.443-445, 1995.
40. YAMADA, Y.; IGUCHI, K.; SHIMADA, Y. Hyrtiosal, a new sesterterpenoid with a novel carbon skeleton from the Okinawan marine Sponge *Hyrtios erectus*. *Journal of Organic Chemistry*, v.57, n.2, p.522-524, 1992.