

Avaliação de atividade imunomodulatória do ácido copálico obtido da resina de Copaíba

Evaluation of the immunomodulatory activity of copalic acid from Copaiba resin

Recebido: 14/04/2023

Revisado: 24/10/2023

Aceito: 24/10/2023

Editor de Seção:

Dr. Sérgio Gomes da Silva

Afiliação do Editor:

Centro Universitário
FAMINAS e Hospital do
Câncer de Muriaé da
Fundação Cristiano Varella.

Bruno Damasceno BAHIA¹, Kézia Cristine Barbosa FERREIRA¹, Danilo de Souza COSTA¹, Chislene Pereira VANELLI², Frederico Pittella SILVA, Ademar Alves DA SILVA FILHO¹, Ana Cláudia Chagas de Paula LADVOCAT¹, José Otávio do Amaral CORRÊA¹.

(1) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Juiz de Fora –MG, Brasil.

(2) Hospital Universitário, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Juiz de Fora –MG, Brasil.

Autor correspondente:

José Otávio do Amaral Corrêa (joseotavio.correa@ufjf.br)

Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Faculdade de Farmácia.

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro.

CEP 36036-900. Juiz de Fora –MG, Brasil.

Tel: +55 32 2102 3893.

Conflitos de interesses: Esta pesquisa não foi financiada ou possui qualquer relação com nenhuma instituição que envolva algum conflito de interesse.

Resumo

Introdução: O sistema imune tem a função de manter a homeostase do organismo, atuando em equilíbrio contra patógenos e tumores. Respostas imunológicas inapropriadas podem promover o surgimento de doenças, entre elas às autoimunes. A resposta imune pode ser modulada através de medicamentos tradicionais, como por exemplo os anti-inflamatórios e os imunossuppressores, os quais estão associados, por vezes, a altos custos e à ocorrência de efeitos adversos graves. Neste cenário, substâncias naturais podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos imunomoduladores. O ácido copálico (AC), presente na resina de *Copaiba sp.*, é um diterpeno natural com potencial atividade imunomodulatória. **Objetivo:** Avaliar os efeitos imunomodulatórios *in vitro* do AC. **Material e Métodos:** Após isolado e identificado da resina de copaíba, o AC teve sua citotoxicidade avaliada pelos métodos de MTT e azul de Tripán. A proliferação celular, a produção de óxido nítrico (NO) (pelo método de Griess) e a produção de citocinas (por ELISA) foram avaliadas em células de camundongos C57BL/6. **Resultado:** O AC não apresentou redução da viabilidade celular em concentrações de 75, 50, 25, 10 e 5 μM . O AC (75 e 50 μM) inibiu a proliferação celular estimulada por concanavalina A e, a 75 μM , reduziu a produção de NO. O AC também foi capaz de reduzir a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12, principalmente a 75 μM . **Conclusão:** O AC apresentou um efeito imunomodulador *in vitro*, reforçando seu potencial anti-inflamatório. Contudo, novos estudos devem ser realizados para esclarecer seu mecanismo de ação.

Palavras chaves: Imunomodulação; produtos naturais; novas drogas terapêuticas; ácido copálico e inflamação.

Abstract

Introduction: The immune system has the function of maintaining the body's homeostasis, acting in balance against pathogens and tumors. Inappropriate immune responses can promote the onset of diseases, including autoimmune diseases. The immune response can be modulated through traditional drugs, such as anti-inflammatories and immunosuppressants, which are sometimes associated with high costs and the occurrence of serious adverse effects. In this scenario, natural substances can be an alternative for the development of new immunomodulatory drugs. Copalic acid (CA), present in *Copaiba sp.* resin, is a natural diterpene with a potential immunomodulatory activity. **Objective:** To evaluate the *in vitro* immunomodulatory effects of CA. **Material and Methods:** After isolated and identified from copaiba resin, the cytotoxicity of AC was evaluated by MTT and Trypan blue methods. Cell proliferation, nitric oxide (NO) production (by Griess method), and cytokine production (by ELISA) were evaluated in cells from C57BL/6 mice. **Results:** CA did not show a reduction in cell viability at concentrations of 75, 50, 25, 10 and 5 μM . CA (75 and 50 μM) inhibited cell proliferation stimulated by concanavalin A and, at 75 μM , reduced NO production. CA was also able to reduce the production of cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-12, mainly at 75 μM . **Conclusion:** CA showed an *in vitro* immunomodulatory effect, reinforcing its anti-inflammatory potential. However, further studies must be carried out to clarify its mechanism of action.

Keywords: Immunomodulation; natural compounds; New therapeutics drugs.

1 Introdução

O sistema imunológico dos vertebrados atua por meio de respostas complementares, pró e anti-inflamatórias que ocorrem a partir de eventos celulares e moleculares regulados por redes, de forma a manter uma homeostase dinâmica essencial para seu bom funcionamento. Sua principal função é prover ao organismo defesa contra patógenos e tumores, de forma que uma imunossupressão torne o indivíduo mais susceptível a estes (GERTSCH; VIVEROS-PAREDES; TAYLOR, 2011). Por outro lado, sua superativação está envolvida em diversas desordens, como nas doenças autoimunes e nos processos inflamatórios crônicos, tais como esclerose múltipla, doença de Crohn e artrites (CHEN et al., 2021).

As doenças inflamatórias mediadas pelo sistema imune são atualmente tratadas com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e/ou por fármacos que modulam as respostas imunes, através de imunossupressão ou imunostimulação (RANG; DALE, 2016). O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, embora promovam efeito anti-inflamatório potente, torna-se limitado já que provocam efeitos adversos frequentes, como lesões gástricas, hipertensão arterial sistêmica, diabetes entre outros. Já os imunossupressores e os imunomodificadores, com custos extremamente elevados, também apresentam importantes efeitos adversos (LIU et al., 2015; ARREOLA et al., 2015).

Nesse contexto, os produtos naturais têm mostrado importante papel no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente como compostos imunomoduladores e anti-inflamatórios (DIAS et al., 2014; JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015), despertando interesse em todo o mundo como alternativa aos métodos terapêuticos tradicionais (ZHANG et al., 2017; QUINTANS et al., 2019).

Entre as amostras naturais com potencial imunomodulatório para aplicações terapêuticas está a óleo-resina de copaíba, o qual é obtido da extração do tronco das árvores de várias espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae), popularmente conhecidas como “copaíba” ou “pau-de-óleo”. Este óleo-resina obtido da copaíba é amplamente utilizada na medicina popular brasileira como agente anti-inflamatório, antimicrobiano e no tratamento de feridas (MEDEIROS; DURÁN; LANG, 2021; GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). Guimarães-Santos et al (2012) demonstraram que o tratamento com óleo-resina reduziu a ativação de macrófagos em 60%, reduzindo também a infiltração mononuclear no córtex motor inflamado de ratos. Ademais, Teixeira et al. (2017)

demonstraram que o óleo-resina de copaíba reduziu o número de macrófagos CD68-positivo em feridas de língua de ratos. Além disso, foi observado que o óleo de copaíba possui efeito imunomodulador *in vitro*, modulando a resposta imune em células Th1 e Th17 (DIAS et al., 2014).

Neste contexto, o ácido copálico (AC) (figura 1) é um diterpeno presente nas espécies de plantas do gênero *Copaifera* (TEIXEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013) e considerado uma das principais substâncias do óleo-resina de copaíba (MEDEIROS; DURÁN; LANG, 2021; ALVES et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018). De acordo com a literatura, o AC apresenta atividades anti-inflamatória (MEDEIROS; DURÁN; LANG, 2021), antifúngica (NAKAMURA et al., 2017), antibacteriana e citotóxica (SOUZA et al., 2011), bem como antitumoral e antimicrobiana (ABRÃO et al., 2015).

No entanto, apesar de seu potencial, a ação imunomodulatória *in vitro* do AC ainda não foi avaliada. Assim, os objetivos deste trabalho foram isolar o AC a partir da resina de copaíba e avaliar seus efeitos imunomoduladores *in vitro* frente à proliferação celular e produção de NO, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-4, IFN- γ , e TNF- α em células murinas.

2 Material e Métodos

2.1. Reagentes

A resina de *Copaifera officinalis* foi obtida da Amazon Oil (Brasil). Os solventes P.A. utilizados nos processos de extração e isolamento, como hexano, acetato de etila, ácido acético glacial e diclorometano, foram adquiridos da Synth (Brasil). Carbonato de sódio anidro P.A. e sílica gel 60Å (40-63 μ m) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA) e a sílica gel 60 (0.015-0.040 mm) da Merck (Alemanha).

2.2 Obtenção, isolamento e identificação do ácido copálico a partir da resina de copaíba

A resina de copaíba (100 g) desta resina foi submetida à cromatografia líquida de baixa pressão (CLV) em sílica gel 60Å (40-63 μ m), utilizando como eluentes misturas de hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 5 frações, de aproximadamente 1000 mL cada, denominadas KF1 (75,1 g; Hex: AcOEt 95:5), KF2 (10,8 g; Hex: AcOEt 95:5), KF3 (4,8 g; Hex: AcOEt 8:2), KF4 (1,9 g; AcOEt) e KF5 (4,1 g; AcOEt). As frações coletadas foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel, hexano: acetato de etila (9:1 v/v), revelação em luz UV (254 nm) e, posteriormente, em anisaldeído

sulfúrico. Após análise, a fração KF1 (75 g) foi submetida à nova CLV em sílica gel 60Å (40-63 µm), empregando misturas de Hex e AcOEt em polaridades crescentes, originando 10 subfrações. Entre estas, a subfração KF1.4 (22 g; Hex: AcOEt 95:5) foi adicionalmente purificada por partição ácido-base, utilizando como fases orgânicas AcOEt e solução Na₂CO₃ 5%, seguida de adição de ácido acético à fase aquosa (pH 3) originando, por precipitação, um sólido branco (530 mg), o qual foi recolhido e submetido à identificação estrutural. A identificação estrutural deste sólido foi realizada por espectroscopia de ¹H RMN (500 MHz) e ¹³C RMN (125 MHz), utilizando CDCl₃ como solvente. Com base nestes dados espectroscópicos obtidos de ¹H RMN (Figura suplementar S1) e ¹³C RMN (Figura suplementar S2) e comparação com os dados encontrados na literatura (FUJII et al., 2009), a estrutura química desta substância foi determinada como sendo o ácido copálico (AC).

2.3 Animais utilizados e obtenção das células

Um total de 16 camundongos fêmeas C57BL/6 (21–23 g; 8–12 semanas de idade) foram obtidos das instalações de cuidados com animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF) e mantidos em gaiolas microisoladoras. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados (20 de julho de 2020) pelo Comitê de Ética em Cuidados com Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo n.º. 009/2020).

Os camundongos foram eutanasiados sob anestesia profunda (i.p.) conforme aprovado pelo comitê de ética. Para a obtenção das células peritoneais, foi realizada a assepsia com etanol 70% (v/v) e então removeu-se a pele da região abdominal dos animais. Em seguida, foram inoculados 5 mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril (pH:7,2) na cavidade abdominal. Após a inoculação, realizou-se massagem abdominal 30 vezes por, aproximadamente, 30 segundos para desprendimento das células, então o líquido peritoneal foi aspirado e transferido para tubo plástico estéril do tipo Falcon. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C (Novatecnica NT 815). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensão em 1 mL de PBS estéril (pH = 7,4). O número de células presente no lavado peritoneal foi contado num hemocítmetro (Câmara de Neubauer). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT e do azul de Tripán. As células também foram utilizadas nos métodos de Griess de determinação do nitrito (NO) e das citocinas por ELISA.

Para a obtenção dos esplenócitos o baço dos animais foi coletado de forma asséptica e, após lavagem com solução de RPMI incompleto estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução e transferidos para tubos de 15 mL. Estas células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C (Novatecnica NT 815). O botão celular foi ressuspensão em solução de cloreto de amônio 0,16M em Tris (hidroximetil) aminometano 0,17 M para causar a lise das hemácias. Este processo foi repetido até lise total das hemácias. As células obtidas foram cultivadas (1 × 10⁶/mL) para o ensaio de proliferação conforme descrito adiante em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 5% soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Denominado após suplementação de RPMI completo), em incubadora umidificada, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

Para os ensaios de viabilidade celular realizada pelos métodos de MTT e azul de Tripán os animais foram divididos em grupos Células (controle de células viáveis), DMSO 2% (grupo controle de mortalidade celular), DMSO 1/400 (grupo controle do veículo diluente) e grupos com concentrações de ácido copálico 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µM. Para os demais experimentos os grupos celulares foram divididos em controle negativo (células não estimuladas), controle positivo (células estimuladas) e grupos ácido copálico 25, 50, 75 µM (as 3 maiores concentrações de composto que não se mostraram citotóxicas neste estudo).

2.4 Viabilidade celular por ensaio de MTT e por método do azul de Tripán

Para avaliar a citotoxicidade, células peritoneais foram tratadas com AC nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µM (todas em triplicata) usando o ensaio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) e o corante azul de Tripán.

2.4.1 Viabilidade celular por ensaio de MTT

A viabilidade celular foi realizada pelo método de MTT, conforme descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). De forma resumida, as células peritoneais foram semeadas em uma densidade de 1 × 10⁵ por poço em uma placa de 96 poços e incubados a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ com RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL (Sigma); penicilina, 50 u/mL (Sigma); aminoácido não essencial, 1% v/v (Sigma); soro fetal bovino, 5% (Sigma); hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM

(Sigma); L. glutamina, 4 mM (Sigma). Após o período de 2 horas para adesão das células peritoneais, o meio foi aspirado e as células novamente incubadas com RPMI completo, por 24 h ou 48 h e com o tratamento por AC nas concentrações anteriormente descritas. Após a incubação, alíquotas de 250 µL de MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) em meio RPMI foram adicionadas a cada poço na placa de 96 poços. As placas foram incubadas nas mesmas condições de temperatura, umidade e CO₂ por mais 3 h. Após a incubação, as placas foram cuidadosamente lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) três vezes. Alíquotas de DMSO de 100 µL foram adicionadas a cada poço e agitadas por 10 min para extrair o formazan insolúvel formado. A absorbância foi medida a 570 nm em um leitor de placas (TP Reader NM; Thermoplate).

2.4.2 Viabilidade celular pelo método do azul de Tripán

A citotoxicidade celular também foi avaliada pela coloração do azul de Tripán (SENFF-RIBEIRO et al., 2004). Para esse ensaio, as células peritoneais foram semeadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, em meio RPMI completo em placas de 24 poços. Após o período de 24 horas de cultura à 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ para adesão, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com PBS e então os poços receberam o AC diluído em meio RPMI 1640 completo nas concentrações mencionadas anteriormente durante o período de 24 h e 48 h nas mesmas condições de incubação. Após essa etapa, as células dos poços foram desaderidas por ação da tripsina e coletadas em um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 0,4% do corante Azul de Tripán diluído em PBS (pH 7,2 -7,4) na proporção de 1:1 volume/volume (v/v). As células foram contadas em Câmara de Neubauer, sendo consideradas não viáveis quando apresentaram em seu interior a coloração azul. Os resultados foram obtidos pelo cálculo: células não coradas / (células coradas + não coradas) x 100.

2.5 Avaliação da proliferação celular

Para o ensaio de proliferação, os esplenócitos foram incubados em RPMI completo à 37°C em incubadora de CO₂ na concentração $1,0 \times 10^6$ células/mL, sendo estimulados com Concanavalina A (ConA, Sigma C2010, Canavalia ensiformis, Brasil) a 5 µg/mL como mitógeno, e também receberam simultaneamente os tratamentos com o AC nas maiores concentrações (75, 50 e 25 µM) que não apresentaram redução da viabilidade pelos métodos de MTT e do azul de Tripán. Após

incubação por 48 h foram retirados os sobrenadantes e adicionados, em cada poço, 100 µL da solução de meio RPMI 1640 e 10 µL do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL, mantendo a placa protegida da luz. A placa foi homogeneizada e novamente incubada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Laboven L212), por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se 100 µL de DMSO por poço. Após agitação a 150 rpm/10 minutos a medida da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (TP Reader) no comprimento de onda de 550 nm, como feito para os ensaios de citotoxicidade

2.6 Níveis de Produção de Nitrito (NO) pelo método de Griess

A medida dos níveis de NO foi feita de acordo com o método de Griess (GREEN et al., 1982), que avalia o acúmulo de nitrito. Resumidamente, células peritoneais foram incubadas sem nenhum estímulo, grupo controle negativo (CN), estimuladas com LPS 1 µg/mL (Sigma), grupo controle positivo e o grupo tratamento estimuladas com LPS 1 µg/mL (Sigma) e seus sobrenadantes de cultura de células peritoneais tratados com AC por 48 h nas concentrações 75, 50 e 25 µM. Os sobrenadantes de culturas contendo os tratamentos nas concentrações que não foram citotóxicas pelos testes de viabilidade celular foram misturados com um volume igual (1/1) de reagente de Griess. O reagente de Griess foi preparado misturando uma parte 0,1% (v/v) de N-(1 naftil)etilenodiamina com uma parte 1% (v/v) sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico. Após 20 min, a absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas (TP Reader NM; Thermoplate). A concentração de nitrito foi calculada usando nitrito de sódio como padrão em uma curva.

2.7 Efeito do ácido copálico sobre a produção de citocinas

As concentrações de IL-1β, IL-6, IL-12, IL-4, IFN-γ, TNF-α em sobrenadantes de células peritoneais tratadas com 75, 50 e 25 µM por 48 h foram medidas pelo método ELISA, de acordo com a recomendação do fabricante (PeProtech Inc, New Jersey). Os grupos foram divididos como na dosagem de NO. A solução a seguir foi aplicada para visualizar a ligação: conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por 1 hora (T° ambiente). Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5), cromógeno ABTS (3-etilbenziazolina-6-sulfonato; Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) e água oxigenada 30% (1 µg/mL). A

reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4 N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (TP Reader) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões recombinantes.

2.8 Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism (versão 9.0). As diferenças significativas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via e pela aplicação do teste de Tukey para comparações múltiplas, com um nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

Existe uma variedade de terapias para o tratamento de doenças causadas por inflamação, como AINEs, glicocorticoides e fármacos relacionadas a esteroides. Apesar desses sucessos notáveis, ainda há necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios, sendo esta busca destaque nos portfólios de pesquisa da maioria das empresas farmacêuticas e de biotecnologia (QUINTANS et al., 2019). Assim, atualmente, novas estratégias terapêuticas são necessárias para prevenir ou tratar doenças que acometem o sistema imune.

Os produtos naturais sempre foram e ainda continuam a ser importante fonte para obtenção de substâncias farmacologicamente ativas, fornecendo enorme arsenal de estruturas e moléculas que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios e fármacos imunomoduladoras (DUTRA et al., 2012; FONTES et al., 2014; QUINTANS et al., 2019).

A respeito disso, estudos anteriores relataram que o óleo de copaíba e alguns de seus metabólitos são capazes de modular importantes marcadores inflamatórios presentes na imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias (DIAS et al., 2014; FONTES et al., 2017; CAPUTO et al., 2020). Entre as substâncias de interesse e de grande potencial farmacológico do óleo-resina de Copaíba está o AC, o qual ainda não foi investigado quanto aos seus efeitos imunomoduladores. Assim, neste estudo, os efeitos imunomoduladores do AC, frente à produção de diferentes mediadores, foram investigados *in vitro* em células murinas de Camundongos C57BL/6.

Primeiramente, o ácido copálico (AC) (Fig. 1) foi isolado da resina de copaíba por fracionamento cromatográfico e, em seguida, identificado por análise de dados 1H e 13C RMN em comparação com a literatura (FUJII et al., 2009). O espectro de RMN de 1H (Figura suplementar S1) evidencia a presença de

um simpleto em 5,67 ppm, correspondente ao hidrogênio olefínico da cadeia lateral. Os dois simpletos largos, com deslocamento em 4,85 e 4,49 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios do grupo exo-metilênico (FUJII et al., 2009). Já o espectro de RMN de 13C (Figura suplementar S2) permitiu observar a presença de 20 átomos de carbono contendo grupos metilas (CH₃), metilênicos (CH₂), metínicos (CH) e carbonos quaternários (C), característicos do AC. Destacam-se os sinais em 148,4 e 106,5 ppm, os quais evidenciam a presença da dupla exocíclica e o sinal em 171,6 ppm (FUJII et al., 2009). A pureza do AC foi estimada como superior a 95% pela análise do espectro de 13C RMN (Figura suplementar S2).

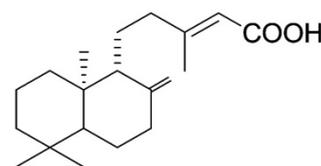


Figura 1. Estrutura química do ácido copálico (AC) isolado da resina da Copaíba.

Após isolamento e purificação do AC, sua citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT e pela coloração de azul de Tripán. Os testes de viabilidade celular ou testes de citotoxicidade são experimentos que avaliam a viabilidade de células por meio da análise quantitativa e/ou qualitativa de sua atividade celular (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Estes ensaios são importantes para triar moléculas e as devidas concentrações destas que sejam tóxicas para as células e possam levá-las à morte (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Os resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade (Figura 2a e 2b) mostraram que o AC, nas concentrações avaliadas (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ M), não apresenta redução estatisticamente significativa da viabilidade celular de células peritoneais, a qual manteve o perfil em 24 e 48h de incubação (Figura 2a e 2b).

Apesar do AC não ter apresentado redução estatisticamente significativa para a viabilidade das células peritoneais, no período de 48 horas (Figura 2b), a concentração de 100 μ M apresentou redução de 25,6% de células viáveis frente às células saudáveis. Embora a diferença não seja estatisticamente significativa, segundo Longo (2013), uma redução maior que 20% do número de células viáveis é indicio de toxicidade.

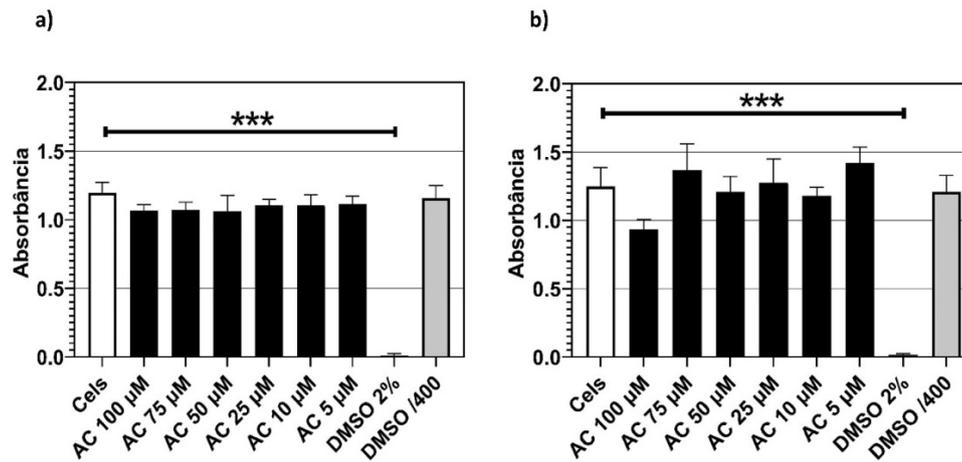


Figura 2. Resultado do ensaio de MTT realizado sobre as células peritoneais tratadas com AC por um período de 24 horas (Figura 2a) e por período de 48 horas (Figura 2b) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 µM. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Neste gráfico, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle (células). Abreviatura: DMSO, dimetilsulfóxido.

Já os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, 24 horas de incubação, utilizando a coloração pelo Azul de Tripán (Figura 3), mostraram que o AC não reduziu a viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas (5, 10, 25, 50, 75 e 100 µM). Contudo, após 48h de incubação, o AC se mostrou citotóxico na concentração de 100 µM, apresentando redução na viabilidade das células peritoneais próxima à 75% (Figura 3). Dados previamente relatados consideram que o azul de Tripán tem baixa exatidão quando a viabilidade celular for menor que 80% (CHAN; RICE; QIU, 2020). Portanto, considerando os resultados obtidos nos ensaios de MTT e azul de Tripán, os quais evidenciam a redução da viabilidade celular pelo AC (100 µM), para os experimentos de dosagem de nitrito e de citocinas foram utilizadas somente as maiores concentrações não citotóxicas observadas nos ensaios de proliferação celular.

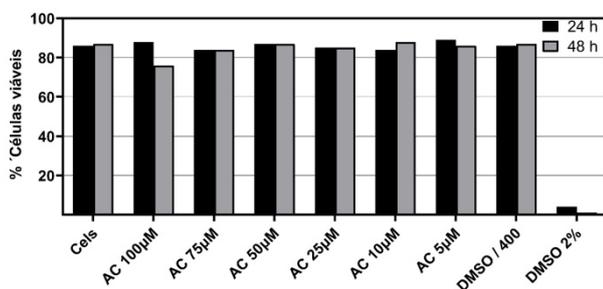


Figura 3. Resultado de viabilidade expresso em porcentagem do ensaio do azul de Tripán sobre as células peritoneais expostas ao AC após 24 e 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 µM. Abreviatura: h, hora; DMSO, dimetilsulfóxido.

De acordo com a literatura, algumas substâncias naturais apresentam efeitos imunomoduladores contra as reações alérgicas e doenças autoimunes pela inibição da proliferação de células autoimunes e regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 e IFN- γ (SHAKOOR et al., 2021).

Estudos prévios mostraram que o flavonoide quercetina exerce efeito imunomodulador inibindo a proliferação de células T autoimunes e a expressão de TNF- α por células mononucleares in vitro, podendo auxiliar no tratamento da esclerose múltipla. Além disso, a quercetina demonstrou ser capaz de reduzir a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (SHAKOOR et al., 2021). Desta forma, a inibição da proliferação celular é uma importante ferramenta para a avaliação da capacidade imunomodulatória de potenciais fármacos.

Assim, neste estudo, os esplenócitos murinos foram estimulados a proliferar pela presença de ConA (utilizada como controle positivo - grupo CP) (Figura 4) e tratadas com AC (25, 50 e 75 µM) (Figura 4). Os resultados evidenciaram que o AC, nas concentrações de 50 e 75 µM, possui efeitos antiproliferativos significativos em células estimuladas pelo ConA (Figura 4).

Além da proliferação celular, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o NO, está intimamente ligada a processos inflamatórios, já que o acúmulo de ROS pode desencadear o estresse oxidativo, implicado diretamente nas disfunções celulares e nos mecanismos reguladores do apoptose celular (DI MEO et al., 2016).

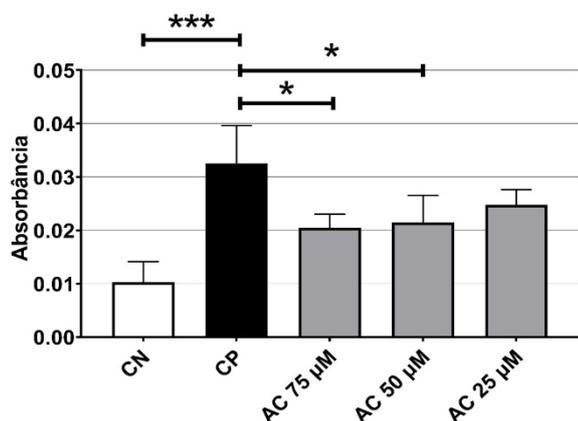


Figura 4. Resultado do ensaio de proliferação celular do AC sobre os esplenócitos murinos no período de 48 horas de incubação nas concentrações de 75, 50 e 25 µM. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Onde, * = p<0,05; *** = p<0,001. Abreviatura: NC, controle negativo; PC, controle positivo; AC, ácido copálico.

O NO é um radical livre com atuações complexas, podendo atuar como mensageiro de sinalização celular em uma ampla gama de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Além disso, o NO pode estar presente em respostas imunes descontroladas, como em doenças autoimunes, causando danos inflamatórios nos tecidos (RICCIO; LAURITANO, 2019).

Neste estudo, os níveis de NO foram mensurados em células peritoneais de camundongos C57Bl/6 estimulados por LPS e tratadas com AC por um período de 48 horas (Figura 5). A análise dos resultados obtidos mostra que o AC (na concentração de 75 µM) foi capaz de inibir significativamente a produção de NO em células peritoneais estimuladas com LPS em comparação ao grupo controle positivo (células que receberam somente o estímulo por LPS).

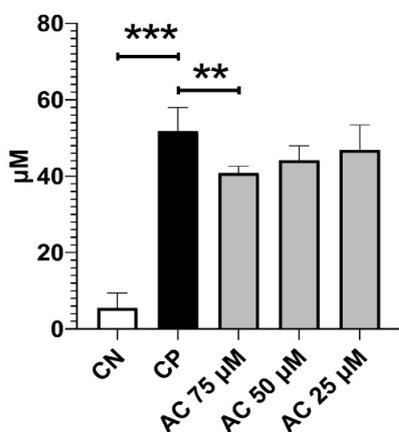


Figura 5. Resultado da produção de nitrito (NO) após incubação com o AC sobre as células peritoneais no período de 48 horas nas concentrações de 75, 50 e 25 µM por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Onde, ** = p<0,01; *** = p<0,001. Abreviatura: NC, controle negativo; PC, controle positivo; AC, ácido copálico.

Os resultados obtidos corroboram com as atividades in vitro de inibição do NO pelo AC reportadas na literatura, as quais verificaram que o AC (100 µM), obtido de *Copaifera* spp., foi capaz de inibir a produção de NO em macrófagos RAW264.7 (MEDEIROS, 2019) e em diferentes linhagens de células tumorais humanas (VARGAS et al., 2015).

Como o AC é um dos principais componentes do óleo-resina de copaíba, o efeito inibitório sobre a produção de NO, observado pelo AC, pode estar relacionado a propriedade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba, a qual é muito bem descrita na literatura (KOBAYASHI et al., 2011; GUSHIKEN et al., 2017; DIEFENBACH et al., 2018). Contudo, não se pode deixar de considerar que outros componentes do óleo-resina também podem contribuir para esta atividade.

Caputo et al. (2020) mostraram que o óleo de copaíba reduziu a produção de NO em células de pulmão de camundongos BALB/c em modelo de asma alérgica. A análise por CG-EM deste óleo de copaíba permitiu identificar o β-cariofileno como constituinte principal (CAPUTO et al., 2020). Neste sentido, trabalhos anteriores evidenciaram que o β-cariofileno possui ação imunomodulatória, sendo capaz de inibir o NO e outras citocinas (FONTES et al., 2017).

Adicionalmente, os macrófagos participam das respostas imunes inatas e também podem ser células efetoras, contribuindo para o combate à infecção, inflamação e cicatrização de feridas (TIAN et al., 2008). Além disso, os macrófagos são capazes de produzir uma variedade de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 e interleucina-6, podendo ser estimulados por produtos bacterianos, como os lipopolissacarídeos (LPS) (SFORCIN et al., 2009).

Assim, o AC foi avaliado quanto à possibilidade de inibição da produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF-α), IL-1, IL-6, IL-12 e IFN-γ (Figura 6). Isto se torna relevante, já que as células do sistema imunológico regulam suas atividades por meio de uma infinidade de diferentes mediadores e citocinas, como interleucinas, TNF-α e INF-γ, produzidos predominantemente por macrófagos e linfócitos (RICCIO; LAURITANO, 2019).

Os resultados obtidos mostraram que o AC é capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias (Figura 6a-e). Nas análises realizadas (Figura 6a-e), é possível observar que as células que foram estimuladas com LPS (grupo PC) produziram significativamente mais citocinas em comparação ao grupo controle negativo (grupo NC). O AC, na concentração de 75 µM,

reduziu significativamente a produção das citocinas IL-1 β (Figura 6a), IL-6 (Figura 6b) e IL-12 (Figura 6c) quando comparado ao grupo controle positivo (grupo CP), o qual recebeu somente o estímulo de LPS. Além disso, a produção de IL-12 (Figura 6c) também foi reduzida após tratamento com AC na concentração de 50 μ .

No entanto, o AC não reduziu de forma significativa a produção das citocinas IFN- γ (Figura 6d) e TNF- α (Figura 6e) em células peritoneais quando comparado com as células estimuladas com LPS (grupo CP). Contudo, ainda que estatisticamente não significativa, é possível observar uma tendência de redução de IFN- γ (Figura 6d) e TNF- α (Figura 6e) pelo AC, especialmente em 75 μ M.

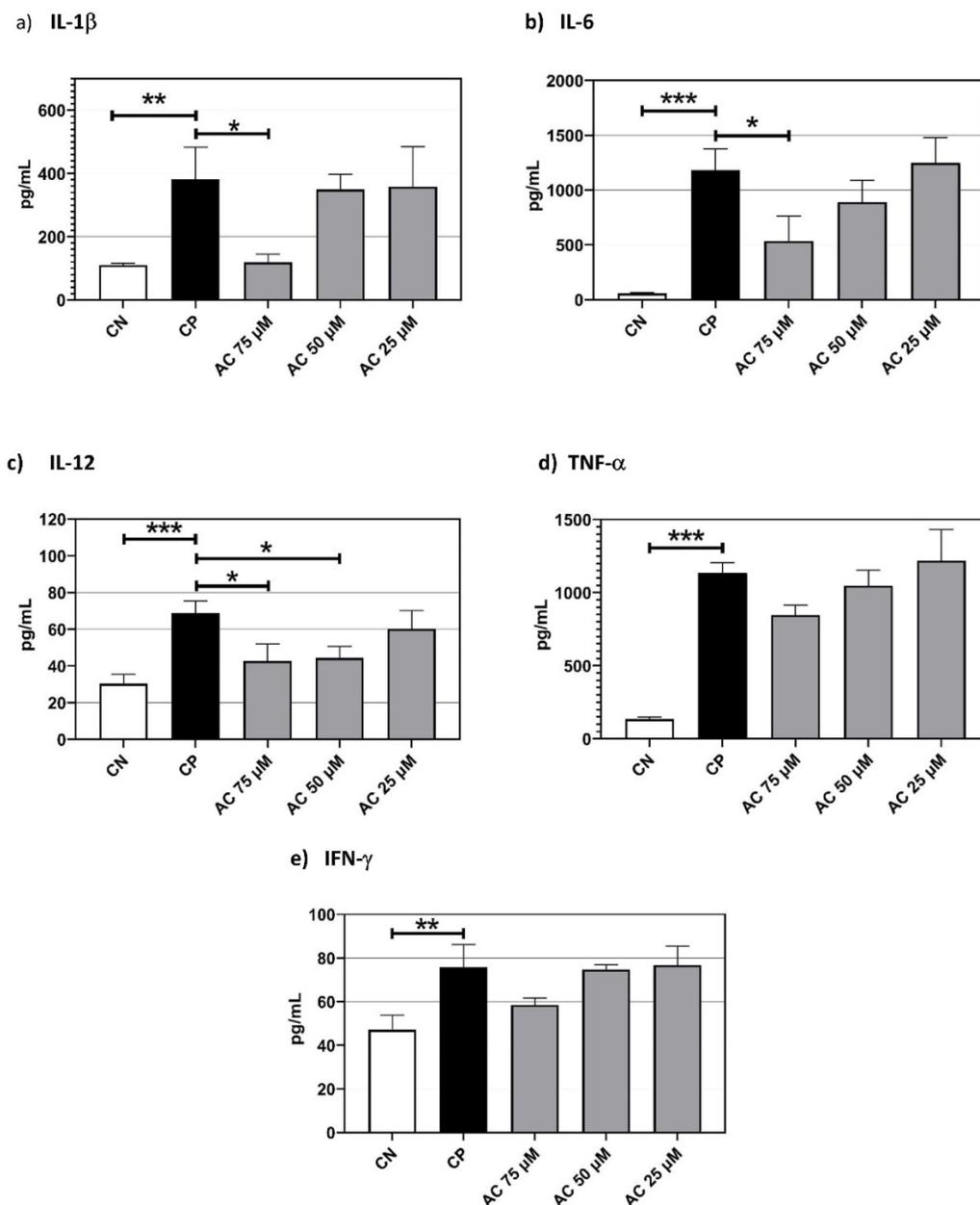


Figura 6. Produção de IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-12 (c), TNF- α (d) e IFN- γ (e) por células peritoneais de camundongos C57BL/6 estimuladas por LPS e incubadas com AC (75, 50 e 25 μ M). Células peritoneais de camundongos não imunizados e não tratados foram usados como grupo de controle negativo (CN) e células peritoneais de camundongos estimuladas somente com LPS foram usadas como grupo controle de estímulo (CP). Após 48 h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas foi medida com um filtro de 440 nm usando um método ELISA. Os dados são apresentados como média \pm DP (n = 5). * P < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

As IL-1 e IL-6 são bem caracterizadas como citocinas pró-inflamatórias (SFORCIN et al., 2009).

A IL-1, também chamada pirógeno endógeno, é sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos, e contribui para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas (SFORCIN et al., 2009). Além disso, A IL-1 β está diretamente envolvida em doenças inflamatórias e articulares, incluindo diabetes tipo 2, aterosclerose, gota, artrite reumatoide, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), lúpus e doença de Alzheimer (WANG et al., 2019; SANCHEZ-LOPEZ et al., 2019; ZHOU; LIU; PENG, 2008).

Ao contrário do TNF e da IL-6, a IL-1 β bioativa não é secretada pela via secretora clássica e sua produção e liberação requerem iniciação de macrófagos, durante a qual a pró-IL-1 β e o sensor de inflamassoma NLRP3 são produzidos (WANG et al., 2019; SANCHEZ-LOPEZ et al., 2019; ZHOU; LIU; PENG, 2008). Em seguida, uma variedade de estímulos secundários é produzida, como ROS, os quais causam danos celulares (ZHONG et al., 2018). Estes estímulos desencadeiam a montagem e ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na conversão de pró-IL-1 β em suas formas maduras, as quais são liberadas de macrófagos ativados por secreção de proteína não tradicional (SANCHEZ-LOPEZ et al., 2019).

Em nossos resultados, e pela primeira vez mostrado, o AC (na concentração de 75 μ M) foi capaz de inibir significativamente a produção de IL-1 β , evidenciando o potencial do AC na modulação da resposta imune onde a IL-1 β está diretamente envolvida, como em vias de inflamassomas onde ocorrem produção de IL-1 β em apoptose induzida por IL-1 β e em várias doenças e processos inflamatórios.

Da mesma forma, a IL-6 é uma interleucina pró-inflamatória e que tem uma distribuição tecidual onipresente, sendo altamente expressa e liberada em várias células, incluindo células T, células B e células não linfoides, como monócitos, fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e células do tecido adiposo (MORIASI et al., 2012).

Além disso, a IL-6 é uma importante citocina circulante, principalmente de fase aguda, atuando no crescimento e na diferenciação celular, e no metabolismo de carboidratos e lipídios. Assim, a produção de IL-6 aumenta rapidamente nas respostas inflamatórias associadas a infecções, lesões agudas ou crônicas, traumas e estresse (SFORCIN et al., 2009).

Mesmo estando claro o papel da IL-6 nos processos agudos, a IL-6 apresenta papel chave em inflamações crônicas,

como na artrite reumatoide. Estudo prévio em modelo de artrite reumatoide mostra que o bloqueio do receptor de IL-6 com os anticorpos monoclonais tocilizumab e sarilumab ocasionam melhoras em manifestações extra articulares, controle da glicemia, densidade óssea, cansaço e humor (FAVALLI, 2020). Além disso, a inibição de IL-6 está relacionada à redução e prevenção da inflamação inflamatória intestinal (MORIASI et al., 2012), sendo alvo de estudos para o tratamento da Doença de Crohn (ITO et al., 2005).

Neste sentido, os resultados obtidos mostram que o AC (75 μ M) inibiu significativamente ($p < 0,05$) a produção de IL-6 em 54,7 %, quando comparado ao grupo controle positivo, evidenciando o potencial farmacológico do AC para o tratamento de doenças associadas à produção de IL-6 (figura 6b).

Já a interleucina-12 (IL-12) é também uma citocina pró-inflamatória que atua na diferenciação de células T virgens em células T helper tipo 1 (Th 1), estimulando a produção de IFN- γ e a subsequente ativação de macrófagos, participando ainda da produção de TNF- α a partir das células NK. Além disso, a IL-12 tem papel essencial na ação antiangiogênica e na resposta Th 1 contra o câncer (LU, 2017), estando envolvida em todos os tipos de células killer T citotóxica e T-helper (células NK, TCD4+, TCD8+) que são cruciais para o desenvolvimento e progressão do câncer (MA et al., 2019).

Adicionalmente, foi demonstrado que na Doença de Alzheimer ocorre suprarregulação de citocinas inflamatórias, principalmente de IL-12 e que a inibição da via de sinalização de IL-12 é capaz de mitigar a amiloidose cerebral (VOM BERG et al., 2012). Ainda, a IL-12 tem papel importante na patogênese psoríase, onde ocorre suprarregulação de citocinas, especialmente IL-12, indicando que há uma relação direta entre a severidade da psoríase e a concentração de IL-12 (ARICAN et al., 2005).

Os resultados obtidos neste estudo mostram, pela primeira vez, que o AC (50 e 75 μ M) é capaz de inibir significativamente a produção de IL-1 β (Figura 6c), sugerindo potencial aplicação terapêutica do AC em doenças inflamatórias relacionadas à produção de IL-12. Contudo, novos estudos devem ser realizados, para assim, aprofundar nas ações moleculares elucidar outros possíveis mecanismos de ações do ácido copálico, como por exemplo, elucidar o papel de mensageiros intracelulares de mediadores inflamatórios.

Portanto, este estudo revela que o AC é uma substância em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores e anti-inflamatórios que podem ser utilizados

para o tratamento de diversas doenças. No entanto, apesar dos efeitos imunomodulatórios promissores observados *in vitro* com o AC, investigações futuras, especialmente em modelos murinos de inflamação, são necessárias para se comprovar os efeitos observados.

5 Referências

ABRÃO, F. et al. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 443, p. 1-10, 2015.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.

ALVES, J. M. et al. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, p. 26-30, 2017.

ARICAN, O. et al. Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 5, p. 273-279, 2005.

ARREOLA, R. et al. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. **Journal of immunology research**, v. 2015, Article ID 401630, p. 1-13, 2015.

CAPUTO, L. S. et al. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 106177, 2020.

CHAN, L. L.; RICE, W. L.; QIU, J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2020.

CHEN, L. et al. NOD-like receptors in autoimmune diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 11, p. 1742-1756, 2021.

4 Conclusão

O presente estudo mostrou que o AC apresenta efeito imunomodulador *in vitro*, sendo capaz de inibir a proliferação celular e diminuir a produção do NO e das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12 em células murinas, não apresentando citotoxicidade quando avaliado em concentrações de até 75 μ M. Os achados reforçam o potencial anti-inflamatório do AC e abre caminho para investigações futuras do AC como agente imunomodulador

DE SOUZA, M. G. M. et al. ent-Copallic acid antibacterial and anti-biofilm properties against Actinomyces naeslundii and Peptostreptococcus anaerobius. **Anaerobe**, v. 52, p. 43-49, 2018.

DI MEO, S. et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, Article ID 1245049, p. 1-44, 2016.

DIAS, D. S. et al. Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12814-12826, 2014.

DIEFENBACH, A. L. et al. Antimicrobial activity of copaiba oil (Copaifera ssp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 586-596, 2018.

DUTRA, R. C. et al. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 531-542, 2012.

FAVALLI, E. G. Understanding the Role of Interleukin-6 (IL-6) in the Joint and Beyond: A Comprehensive Review of IL-6 Inhibition for the Management of Rheumatoid Arthritis. **Rheumatology and therapy**, v. 7, n. 3, p. 473-516, 2020.

FONTES, L. B. A. et al. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 886-894, 2014.

FONTES, L. B. A. et al. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in

- C57BL/6 mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 257-264, 2017.
- FUJII, M. et al. Enzymatic resolution of albicanol and its application to the synthesis of (–)-copalic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 4, p. 254-260, 2009.
- GERTSCH, J.; VIVEROS-PAREDES, J. M.; TAYLOR, P. Plant immunostimulants—Scientific paradigm or myth? **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 385-391, 2011.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GUIMARÃES-SANTOS, A. et al. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 918174, p. 1-9, 2012.
- GUSHIKEN, L. F. S. et al. Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, Article ID 6589270, p. 1-15, 2017.
- ITO, H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. **Journal of Gastroenterology**, v. 40, (Suppl XVI), p. 32-34, 2005.
- JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 655, p. 1-18, 2015.
- KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.
- LIU, X. B., et al. An in vivo and in vitro assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 287-294, 2015.
- LONGO, D. L. **Avaliação da citotoxicidade e expressão de citocinas induzidas por resina composta fotopolimerizável**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- LU, X. Impact of IL-12 in Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 17, n. 8, p. 682-697, 2017.
- MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research** 2015, v. 4, n. 1465, p. 1-13, 2019.
- MEDEIROS, V. G. **Isolamento, síntese e avaliação da atividade biológica de diterpenos do tipo labdano**. 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares.
- MEDEIROS, V. G.; DURÁN, F. J.; LANG, K. L. Copalic acid: occurrence, chemistry, and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 4, p. 375-386, 2021.
- MORIASI, C. et al. Prevention of colitis-associated cancer: natural compounds that target the IL-6 soluble receptor. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 12, n. 10, p. 1221-1238, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NAKAMURA, M. T. et al. Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1377-1383, 2017.
- OLIVEIRA, R. B. et al. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaf Extract on the Ethylene Glycol-Induced Nephrolithiasis in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 131372, p. 1-10, 2013.

- QUINTANS, J. S. et al. Monoterpenes modulating cytokines-A review. **Food and chemical toxicology**, v. 123, p. 233-257, 2019.
- RANG, H. P.; DALE, M.M. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016, p. 226.
- RICCIO, G.; LAURITANO, C. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, v. 18, n. 2, p. 1-18, 2020.
- SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. Choline uptake and metabolism modulate macrophage IL-1 β and IL-18 production. **Cell metabolism**, v. 29, n. 6, p. 1350-1362. e7, 2019.
- SENFF-RIBEIRO, A. et al. Cytotoxic effect of a new 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British journal of cancer**, v. 91, n. 2, p. 297-304, 2004.
- SFORCIN, J. M. et al. Lemongrass effects on IL-1 β and IL-6 production by macrophages. **Natural product research**, v. 23, n. 12, p. 1151-1159, 2009.
- SHAKOOR, H. et al. Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 728, 2021.
- SOUZA; A. B. et al. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9619, 2011.
- TEIXEIRA, F. B. et al. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2017.
- TIAN, Y. et al. Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. **The Journal of cell biology**, v. 181, n. 6, p. 945-957, 2008.
- VARGAS, F. S. et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015.
- VOM BERG, J. et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **Nature medicine**, v. 18, n. 12, p. 1812-1819, 2012.
- WANG, B. et al. Aucubin protects chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis in vitro and inhibits osteoarthritis in mice model. **Drug design, development and therapy**, v. 13, p. 3529-3538, 2019.
- ZHANG, M. et al. Parthenolide inhibits the initiation of experimental autoimmune neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 305, p. 154-161, 2017.
- ZHONG, Zhenyu et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 560, n. 7717, p. 198-203, 2018.
- ZHOU, P. H.; LIU, S. Q.; PENG H. The effect of hyaluronic acid on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 12, p. 1643-1648, 2008.