UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do
extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii***

Ana Paula Santin Brancalion

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Ana Paula Santin Brancalion

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2010

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

Brancalion, Ana Paula Santin

Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii*. Ribeirão Preto, 2010.
82 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *C. langsdorffii*.
2. Cálculo renal.
3. Nefrolitíase.
4. Flavonóides.
5. Ensaio antilitiásico in vivo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Santin Brancalion

Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional e ao meu querido Diogenes, que mesmo à distância, sempre esteve presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, por acreditar em meu potencial e proporcionar-me a realização deste trabalho sob sua orientação;

Aos meus pais Pedro e Valdete, por me oferecerem os artifícios, sejam eles emocionais ou financeiros, para a realização deste sonho e por sempre acreditarem no conhecimento e na educação acima de tudo;

Ao meu querido irmão Pedro Henrique, o maior responsável pelo “mergulho” no mundo da ciência;

Ao meu namorado Diogenes e aos seus pais Diogenes e Bernadete, que além de grandes incentivadores, proporcionaram-me preciosos momentos de diversão e “relax” durante esta etapa da minha vida;

À minha cunhada Carolina que, além de estar sempre na torcida, disponibilizou algumas horas do pouco tempo que passa com meu irmão para que ele me auxiliasse na revisão da Dissertação;

Ao querido amigo e exímio pesquisador Ms. João Paulo Barreto de Sousa, que esteve ao meu lado durante toda a realização deste trabalho, sempre disposto a transmitir seu conhecimento e oferecer sua sincera amizade;

À toda equipe do laboratório de Farmacognosia: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, Profa. Dra. Nieve Furtado, os técnicos Valter e Mário e os alunos Bruno, Daniela, Eliane, Mariza, Rejane, Renata e William. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e principalmente pela amizade durante nossa caminhada;

Ao grupo de pesquisas da Disciplina de Nefrologia da Unifesp, por me receberem tão bem e estarem sempre dispostos a ajudar quando precisei;

Ao querido amigo e pesquisador Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros. Devo a ele praticamente tudo o que sei sobre nefrolitíase;

Às amigas de longa data Marcela Delphino e Érika Estado, pela hospedagem durante os períodos em que estive em São Paulo aprendendo e realizando experimentos de litíase em ratos;

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, por seus valiosos ensinamentos e por permitir-nos a utilização de seu laboratório durante algumas etapas deste trabalho;

Ao técnico José Carlos Tomaz, pela prontidão em realizar os experimentos de espectrometria de massas;

À Rossana, da Secretaria de Pós-Graduação, pela disposição em nos ajudar a solucionar todos os problemas;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Àqueles que não foram citados mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, minhas desculpas e meu sincero agradecimento.

RESUMO

BRANCALION, A. P. S. **Estudo fitoquímico e investigação da atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii***. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A nefrolitíase pode ser definida como uma consequência de alterações nas condições de cristalização da urina no trato urinário. A incidência desta patologia nos Estados Unidos é de 5 % em mulheres e 12 % em homens e sua recorrência é de 50 % em 5 a 10 anos e 75 % em 20 anos. Cálculos renais são compostos por porções inorgânicas e orgânicas. Em seres humanos, a porção inorgânica é principalmente composta por sais de cálcio (cerca de 80 %), seguido pelos cálculos de ácido úrico (5-10 %). Estes também podem ser compostos por estruvita, cistina, entre outros. Quanto à matriz orgânica, ela é formada predominantemente por proteínas, como a nefrocalcina, osteopontina, hemoglobina, proteína de Tamm Horsfall, entre outras. As formas de tratamento desta patologia consistem em intervenção cirúrgica ou litotripsia de ondas de choque extracorpóreas (LOCE). As plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* (Fabaceae, caesalpinoideae) são nativas de regiões tropicais da América Latina e da África Ocidental. Conhecidas no Brasil como copaibeiras, e popularmente como pau d'óleo, estas árvores encontram-se amplamente distribuídas na Amazônia e regiões centrais do Brasil. *C. langsdorffii* Desf. é a espécie mais comum fora da Região Amazônica. Estudos realizados com seu óleo-resina demonstraram diferentes atividades biológicas, tais como cicatrizante e anti-inflamatória. Partes aéreas de *C. langsdorffii* foram coletadas no Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e utilizadas na obtenção do extrato hidroalcoólico 7:3. Este extrato foi submetido a diferentes modalidades cromatográficas com o objetivo de isolar seus principais componentes. Para os ensaios in vivo, as pastilhas de oxalato de cálcio foram obtidas por meio de uma reação de supersaturação e a nefrolitíase foi induzida introduzindo-se estas pastilhas na bexiga de ratos. O tamanho dos cálculos, a bioquímica urinária e variáveis gerais, tais como peso corpóreo, volume de urina coletada por 24 horas e volume de água ingerida foram determinados. O extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *C. langsdorffii* é constituído majoritariamente de compostos polares. Duas substâncias pertencentes à classe dos flavonóides foram isoladas e identificadas: os flavonóis quercetrina (quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo) e canferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo. No ensaio in vivo, os animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* apresentaram menor média na massa de cálculos formados e menor média no número de cálculos formados (matriz + satélites). Além disso, sugere-se que o tratamento com o extrato altere a morfologia dos cálculos, já que a pressão necessária para desintegrar os cálculos dos animais sem tratamento é, em média, cerca de duas vezes maior do que a necessária para desintegrar aqueles retirados de animais tratados ($6,90 \pm 3,45$ vs. $3,00 \pm 1,51$ kgf).

Palavras-chave: *C. langsdorffii*, cálculo renal, nefrolitíase, flavonóides, ensaio antilitiásico in vivo.

ABSTRACT

BRANCALION, A. P. S. **Phytochemical studies and investigation of antilithiatic activity of the hydroalcoholic extract of aerial parts of *Copaifera langsdorffii***. 2010. 82p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Nephrolithiasis can be defined as a consequence of alterations in the crystallization conditions of urine in the urinary tract. The incidence of the disease in United States is 5 % in women and 12 % in men and the recurrence is 50 % in 5 to 15 years and 75 % in 20 years. Renal calculi are composed by inorganic and organic portions. In humans, the inorganic portion is principally composed by calcium salts (around 80 %) and uric acid calculi (5-10 %). Also, they can be composed by struvite, cystine and so on. As far as the organic matrix is concerned, proteins, like nephrocalcin, osteopontin, hemoglobin and Tamm Horsfall protein basically compose it. The current treatment of nephrolithiasis is based on surgical interventions and extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). Plants belonging to the genus *Copaifera* (Fabaceae, caesalpinoideae) are native of tropical regions of Latin America and Occidental Africa. In Brazil, known as copaibeiras, they are widely found in Amazon and central regions. *C. langsdorffii* Desf. is the specie commonly found out of the Amazon region. Studies with its oil-resin have showed biological properties, including healing and anti-inflammatory activities. Aerial parts of *C. langsdorffii* were collected at the FCFRP - USP Campus and used to obtain the hydroalcoholic extract 7:3. The extract was submitted to several chromatographic procedures in order to isolate its main compounds. In the in vivo assays, calcium oxalate disks were obtained by a supersaturation reaction and nephrolithiasis was induced by the introduction of those disks in the bladder of rats. Calculi size, urinary biochemistry and general parameters, e.g. body weight, 24 hours urine and water volume ingested were determined. Hydroalcoholic extract of aerial parts of *C. langsdorffii* is rich in polar compounds. Two compounds from flavonoids group were isolated and identified: the flavonols quercitrin (quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside) and kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside. Results of in vivo experiments demonstrated that animals treated with *C. langsdorffii* showed reductions in the mean calculi mass and in the mean number of calculi (matrix and satellites). Besides, the experiment suggests that the treatment with *C. langsdorffii* modifies the calculi morphology, since the pressure needed to break calculi of non-treated animals is more than two-fold larger than the pressure needed to break those taken from treated animals (6,90 $\pm$ 3,45 vs. 3,00 $\pm$ 1,51 kgf).

Keywords: *C. langsdorffii*; renal calculi; nephrolithiasis; flavonoids; antilithiatic in vivo studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Copaifera langsdorffii</i> . (A) Foto panorâmica; (B) tronco; (C) ramo com folhas e flores; (D) sementes e frutos.....	15
Figura 2. Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência.....	26
Figura 3. Pastilha de oxalato de cálcio.....	29
Figura 4. Cirurgia para introdução da pastilha.....	30
Figura 5. Perfil cromatográfico de EBC obtido por CLAE.....	35
Figura 6. Cromatograma da fração EBCAq obtido em CLAE no modo semipreparativo.....	37
Figura 7. Análise em CLAE (281 nm) da fração obtida por fracionamento da fração EBCA em coluna clássica.....	38
Figura 8. Perfil cromatográfico de EBC obtido por CLAE dividido em duas regiões: A , referente à porção que contém os componentes presentes na fração EBCAq e B , referente à porção que contém as substâncias JPA3 e JPA4.....	40
Figura 9. Estruturas químicas dos flavonóis quercetrina (JPA3) e kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (JPA4) isoladas do extrato bruto de partes aéreas de <i>C. langsdorffii</i>	41
Figura 10. Cálculos e satélites retirados dos animais de cada grupo estudado.....	49
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância JPA3 (100 MHz, D_3COD).....	72
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).....	73
Figura 13. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).....	74
Figura 14. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).....	75
Figura 15. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).....	76

Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C da substância JPA4 (100 MHz, DMSO- d_6).....	77
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO- d_6).....	78
Figura 18. . Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO- d_6).....	79
Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO- d_6).....	80
Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO- d_6).....	81
Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO- d_6).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimentos de cada fração obtida por processo de partição.....	19
Tabela 2 – Sequências de eluições realizadas no processo de fracionamento.	24
Tabela 3 – Fracionamento da fração EBCA por coluna clássica.....	25
Tabela 4 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JPA3.....	43
Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JPA4.....	45
Tabela 6 – Parâmetros gerais dos animais.....	46
Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos urinários dos animais.....	47
Tabela 8 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais.....	48
Tabela 9 – Parâmetros de função renal dos animais.....	48
Tabela 10 – Dados referentes aos cálculos retirados dos animais.....	49
Tabela 11 – Parâmetros gerais dos animais do grupo A.....	63
Tabela 12 – Parâmetros gerais dos animais do grupo B.....	63
Tabela 13 – Parâmetros gerais dos animais do grupo C.....	63
Tabela 14 – Parâmetros gerais dos animais do grupo D.....	64
Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo A.....	65
Tabela 16 – Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo B.....	65
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo C.....	65
Tabela 18 – Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo D.....	66
Tabela 19 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo A.....	67
Tabela 20 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo B.....	67
Tabela 21 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo C.....	67
Tabela 22 – Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo D.....	68
Tabela 23 – Parâmetros de função renal dos animais do grupo A.....	69
Tabela 24 – Parâmetros de função renal dos animais do grupo B.....	69
Tabela 25 – Parâmetros de função renal dos animais do grupo C.....	69
Tabela 26 – Parâmetros de função renal dos animais do grupo D.....	70
Tabela 27 – Análise dos cálculos retirados dos animais do grupo C.....	71
Tabela 28 – Análise dos cálculos retirados dos animais do grupo D.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaOx	Oxalato de cálcio
CC	Coluna clássica
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CLAE	Cromatografia de fase líquida de alta eficiência
CG-EM	Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas
COD	Oxalato de cálcio diidratado
COM	Oxalato de cálcio monoidratado
COT	Oxalato de cálcio triidratado
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DATASUS	Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde
D ₃ COD	deutero-metanol
DMSO-d ₆	deutero-dimetilsulfóxido
EBC	Extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i>
EBCA	Fração em acetato de etila do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i>
EBCAq	Fração aquosa do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i>
EBCCDM	Fração diclorometânica do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i>
EBCH	Fração hexânica do extrato bruto das folhas de <i>C. langsdorffii</i>
ESI-EM	Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”
IR	Índice de retenção
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
LOCE	Litotripsia de ondas de choque extracorpóreas
m	múltiplo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s (l)	singleto largo
SUS	Sistema Único de Saúde
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico (ppm)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Nefrolitíase	3
1.3 Produtos naturais no tratamento da nefrolitíase	9
1.4 O gênero <i>Copaifera</i>	12
1.5 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Informações gerais referentes aos materiais utilizados	17
3.2 Material vegetal: coleta, identificação, estabilização e moagem	17
3.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico	18
3.4 Fracionamento do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i> por meio de partição líquido-líquido	18
3.5 Determinação do perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i> utilizando CLAE	20
3.6 Caracterização química preliminar das frações EBCH, EBCDCM e EBCA	21
3.7 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i>	23
3.8 Fracionamento da fração em acetato de etila (EBCA) por coluna clássica	24
3.9 Purificação de subfração obtida a partir do fracionamento da fração EBCA por coluna clássica	25
3.10 Identificação estrutural das substâncias isoladas	26
3.11 Estudo de eficácia pré-clínica antilitiásica do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> em animais	27
3.11.1 Animais	27
3.11.2 Pastilha de oxalato de cálcio (CaOx)	28
3.11.3 Protocolo experimental	29
3.11.3.1 Introdução das pastilhas	29
3.11.3.2 Padronização do modelo de corpo estranho para tratamento com <i>C. langsdorffii</i>	30
3.11.3.3 Administração do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i>	31
3.11.4 Grupos experimentais	31
3.11.5 Análises	32
3.11.5.1 Análises bioquímicas	32
3.11.5.2 Obtenção dos cálculos	32
3.11.5.3 Análise estatística	33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i>	34
4.2 Fracionamento da fração em acetato de etila (EBCA) por coluna clássica..	37
4.3 Elucidação estrutural das substâncias JPA3 e JPA4.....	40
4.4 Estudo de eficácia pré-clínica antilitiásica do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> em animais.....	45
4.4.1 Parâmetros gerais.....	45
4.4.2 Parâmetros bioquímicos urinários.....	46
4.4.3 Parâmetros bioquímicos séricos.....	47
4.4.4 Análise dos cálculos.....	48
4.5 Considerações finais.....	50
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	63

ANEXOS

Anexo 1. Parâmetros gerais.....	63
Anexo 2. Parâmetros bioquímicos urinários.....	65
Anexo 3. Parâmetros bioquímicos séricos.....	67
Anexo 4. Parâmetros de função renal.....	69
Anexo 5. Análises dos cálculos.....	71
Anexo 6. Espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da substância JPA3.....	72
Anexo 7. Espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da substância JPA4.....	77

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

Os produtos naturais têm sido investigados e utilizados para tratar doenças desde o início da história do homem. Por volta de 1900, antes da “Era Sintética”, 80% de todos os remédios eram obtidos de raízes, cascas e folhas (MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). No Brasil, a utilização de plantas medicinais pelos povos indígenas foi descrita pelos portugueses em 1500 (PETROVICK; MARQUES; DE PAULA, 1999).

A partir do século XIX, o uso de plantas como medicamentos passou a envolver o isolamento de compostos ativos, iniciando-se com o isolamento da morfina de *Papaver somniferum* (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Outros fármacos de grande importância na terapêutica também foram obtidos de plantas, tais como a digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* e atropina de *Atropa belladonna* (RATES, 2001).

A Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultaram em uma preferência por produtos sintéticos para o tratamento farmacológico. A maior facilidade de obterem-se compostos puros e modificá-los a fim de torná-los mais potentes e seguros, aliada ao aumento do poder econômico das indústrias farmacêuticas, motivaram tal preferência (RATES, 2001). Adicionalmente, grande interesse tem sido voltado à modelagem molecular, química combinatória e outras técnicas de química sintética, bem como aos bioensaios em larga escala (HTS - “high-throughput screening”) (BUTLER, 2004; MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000, 2003).

Todavia, os produtos naturais ainda desempenham um papel fundamental no descobrimento de fármacos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), mais de 90% das classes terapêuticas atualmente utilizadas derivam de produtos naturais. Além disso, Newman e Cragg (2007) demonstraram que a área dos produtos naturais forneceu, direta ou indiretamente, aproximadamente 50% de novas micromoléculas lançadas entre 2000 e 2006.

Produtos naturais derivam do fenômeno da biodiversidade, ou seja, da riqueza na variedade de organismos na ecosfera. A interação entre estes organismos e o ambiente tem como consequência a evolução de diferentes estruturas químicas complexas nestes organismos, as quais aumentam sua sobrevivência e competitividade (MC CHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Estas estruturas químicas comuns aos produtos naturais tais como centros quirais, anéis aromáticos e heteroátomos têm se mostrado altamente relevantes no processo de descobrimento de fármacos (KOEHN; CARTER, 2005).

No entanto, o uso de plantas como fonte de novos fármacos é um campo ainda pouco explorado. Dentre as estimadas 250-500 mil espécies de plantas, somente 5% têm sido estudadas quanto à fitoquímica e uma porcentagem ainda menor têm sido avaliadas sob aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Com relação ao Brasil, embora possua uma rica flora contendo mais de 20% das espécies conhecidas do mundo, muito pouco de seu potencial tem sido explorado como fonte de novas moléculas (PETROVICK; MARQUES; DE PAULA, 1999).

1.2 Nefrolitíase

Atualmente, uma das definições aceitáveis para a nefrolitíase é dada como a consequência de alterações nas condições de cristalização da urina no trato urinário. Considerando um indivíduo saudável, durante a permanência da urina no trato urinário, os cristais não se formam ou, quando formados, são tão pequenos que são eliminados. Este fenômeno é conhecido como cristalúria assintomática. No entanto, quando as condições de cristalização encontram-se alteradas, as taxas de nucleação e agregação dos cristais tornam-se elevadas, dificultando a eliminação dos mesmos devido ao seu tamanho (GRASES; COSTA-BAUZÁ; PRIETO, 2006).

A incidência desta patologia nos Estados Unidos é de 5% em mulheres e 12% em homens, resultando em média de 12 horas de trabalho perdidas por pessoa e custo de aproximadamente 3.500 dólares por paciente (MERCHANT *et al.*, 2008). No Brasil, segundo dados do Departamento de Informação e Informática do SUS / DATASUS, em 2004 ocorreram 773.215 internações (6,7%) por doenças do trato genitourinário, sendo que 71.317 foram por urolitíase, representando custo de mais de 18 milhões de reais e perda de cerca de três dias de trabalho (BARROS, 2006). Além disso, é de alta recorrência, com taxa de 50% em 5 a 10 anos e 75% em 20 anos (MOE, 2006).

O cálculo renal é formado por meio de uma sequência de eventos: supersaturação da urina, nucleação, crescimento do cristal, agregação e retenção do cristal (BALAJI; MENON, 1997).

Considerando o nível de saturação, este pode ser definido como uma situação em que, sob determinado pH e temperatura, a concentração de sais atinge o limite de solubilidade, ou seja, uma quantidade adicional de soluto não poderá ser

solubilizada. Quando a concentração de solutos aumenta além do nível de saturação, o sistema fica em estado de supersaturação, o qual é termodinamicamente instável (MANDEL, 1996). Tendo em vista que a formação de partículas cristalinas na urina inicia-se pela supersaturação, esta condição torna-se essencial para a formação de cálculos renais (TSUJIHATA, 2008).

Com relação à nucleação, seu objetivo principal consiste em atingir um estado termodinamicamente mais estável. Neste processo, os íons e moléculas se organizam e formam microcristais, reduzindo desta forma o excesso de energia livre (MANDEL, 1996). Apesar de a supersaturação favorecer a precipitação espontânea dos primeiros cristais (nucleação homogênea), a nucleação na urina usualmente ocorre em superfícies pré-existentes, tais como células epiteliais ou hemácias resultando em nucleação heterogênea (BALAJI; MENON, 1997).

Devido a interações entre as partículas no trato urinário, novos componentes de cristais podem migrar da solução e tornar-se parte da estrutura do cristal, promovendo o crescimento do cristal e reduzindo ainda mais a energia livre do sistema. As partículas cristalinas, uma vez formadas, podem aproximar-se e unirem-se umas as outras, resultando em agregação (MANDEL, 1996).

Quanto à retenção dos cristais, sugere-se que para que eles cresçam ao ponto de tornarem-se cálculos, é necessário que os mesmos encontrem-se ancorados em células epiteliais. Quando um cristal está retido no rim, seu crescimento pode ocorrer quando a urina encontra-se supersaturada ou quando novas partículas cristalinas agregam-se a ele (BALAJI; MENON, 1997).

Cálculos renais são compostos por porções inorgânicas e orgânicas (MOE, 2006). Em seres humanos, a porção inorgânica é principalmente composta por sais de cálcio (cerca de 80%), seguido pelos cálculos de ácido úrico (5-10%). Estes

também podem ser compostos por estruvita, cistina, entre outros (MANDEL, 1996; MOE, 2006). Quanto à matriz orgânica, ela é formada predominantemente por proteínas, como a nefrocalcina, osteopontina, hemoglobina, proteína de Tamm Horsfall, entre outras (GROVER *et al.*, 1998).

O oxalato de cálcio no organismo pode ser encontrado em três diferentes formas: cristal de oxalato de cálcio monohidratado (COM), dihidratado (COD) e trihidratado (COT). Os cristais mono e dihidratados são predominantes em cálculos renais, enquanto que o trihidratado, por ser termodinamicamente menos estável e, portanto mais solúvel, é menos encontrado (NANCOLLAS *et al.*, 1991).

Existem determinados fatores capazes de favorecer a formação de cálculos, tais como herança genética, clima, dieta e sedentarismo. Considerando-se a herança genética, a hiperoxalúria primária do tipo I é uma patologia decorrente de alterações nas bases dos genes que codificam a enzima peroxissomal alanina-glioxilato aminotransferase, na qual a excreção de oxalato encontra-se aumentada e consequentemente a urina torna-se supersaturada (DANPURE, 2005). Quanto aos fatores climáticos, regiões quentes facilitam a perda de fluidos. Em casos em que não há reposição adequada de líquidos, o processo de supersaturação da urina é favorecido (HARVEY; HILL; PAK, 1990). No que diz respeito à atividade física, é nítida a relação entre o sedentarismo e a incidência de formação de cálculos. Profissionais que exercem atividades com maior trabalho físico apresentam menor incidência quando comparados àqueles com atividade profissional de menor esforço físico (CURHAN *et al.*, 1993). Adicionalmente, o sobrepeso e a obesidade contribuem para o aumento da incidência e prevalência desta doença (SIENER, 2006).

Os hábitos dietéticos de diferentes populações vêm sendo reavaliados, já que estão diretamente ligados à qualidade de vida de cada indivíduo. No que diz respeito à nefrolitíase, este trabalho deve ser ainda mais incentivado visto que, neste caso, além da dieta representar um fator de risco de proporção significativa, sua modificação pode evitar a ocorrência ou recidiva da litíase urinária.

Alguns componentes dietéticos podem ser manipulados a fim de prevenir eventos relacionados à calculose. Dentre eles incluem-se a ingestão de fluidos, sódio, proteína animal, frutas, cálcio e oxalato (MOE, 2006).

O efeito positivo da ingestão de fluidos, especialmente a água, vem sendo comprovado em estudos epidemiológicos e relaciona-se diretamente ao impedimento da supersaturação da urina (CURHAN *et al.*, 1998). Com relação ao sódio, sabe-se que sua restrição na alimentação tem como efeito principal a redução na concentração de cálcio urinário, além de efeitos adicionais, como aumento na concentração de citrato urinário e redução na saturação de urato de sódio. Estas atividades, em conjunto, podem ser capazes de minimizar a precipitação de oxalato de cálcio (BORGHI; SCHIANCHI; MESCHI, 2002).

A ingestão excessiva de proteína animal, por sua vez, provoca redução no pH urinário, com consequente aumento na formação de ácido úrico. Tendo em vista que o ácido úrico está em equilíbrio com urato em pK de 5,5, qualquer redução no pH desloca este equilíbrio e a quantidade de ácido úrico excede a de urato. Uma abordagem interessante em uma dieta com restrição de proteína animal é a de incluir as frutas, principalmente aquelas ricas em potássio. Estas garantem o fornecimento de ânions orgânicos, os quais são metabolizados em álcalis, neutralizando o ácido proveniente da ingestão de proteína (CURHAN *et al.*, 2004).

Quanto à modificação na ingestão de cálcio, atualmente a restrição não é mais recomendada. Visto que o cálcio e o oxalato ligam-se no intestino, qualquer redução na concentração de cálcio urinário proveniente de restrição dietética é anulada pelo aumento de oxalato livre na urina. No entanto, esta hiperoxalúria secundária ocasionada por restrição de cálcio pode ser evitada se houver também um controle na ingestão de alimentos contendo oxalato (VON UNRUH *et al.*, 2004).

O consumo excessivo de vitaminas C e D também podem ser potencialmente danosos, já que causam hiperoxalúria e hipercalcúria, respectivamente (MOE, 2006).

É importante destacar que fatores relacionados à morfoanatomia do aparelho urinário, como a presença de cavidades, as quais notavelmente aumentam o tempo de permanência da urina no rim, ou a existência de um uroepitélio lesionado que atua como um núcleo para a agregação dos cristais, também propiciam a formação de cálculos (COSTA-BAUZÁ *et al.*, 2005).

Adicionalmente, sugere-se que indivíduos formadores de cálculos possuem baixa concentração ou ausência de inibidores de calcificação na urina. Estes inibidores, tais como a nefrocalcina, a proteína de Tamm-Horsfall e os glicosaminoglicanos, são moléculas que demonstraram algum tipo de atividade inibitória de calcificação em testes laboratoriais. O papel delas na urina, todavia, pode ser diferente já que neste caso as substâncias não atuam isoladamente. Além disso, como afirmado anteriormente, algumas delas são encontradas nas matrizes orgânicas dos cálculos, evidenciando a complexidade em estabelecer o papel dessas moléculas *in vivo* (WORCESTER, 1996).

Com relação ao tratamento da nefrolitíase, o advento da litotripsia de ondas de choque extracorpóreas (LOCE) fez com que os procedimentos cirúrgicos

passassem a serem menos adotados. No entanto, além dos efeitos traumáticos das ondas de choque, da permanência de resíduos de cálculo e da possibilidade de infecção, sugere-se que o tratamento por LOCE possa causar falência renal aguda, diminuição da função renal e aumento da recorrência de pedras (KARADI *et al.*, 2006).

Após a remoção dos cálculos, o tratamento visa normalizar os distúrbios metabólicos detectados no estabelecimento do diagnóstico, prevenindo desta forma a recidiva. O princípio básico da terapia consiste no aumento da ingestão de líquidos e na modificação da dieta. Quanto à abordagem farmacológica, tratando-se de pacientes hipercalciúricos, os diuréticos tiazídicos são os melhores agentes terapêuticos já avaliados (MOE, 2006). Em situações de hiperuricosúria, o alopurinol parece ser eficiente em normalizar o nível de ácido úrico urinário (ETTINGER *et al.*, 1986). Outras abordagens envolvem a erradicação da infecção, quando se trata de cálculos de estruvita e a manipulação da química urinária em casos de cistinúria, em que se aumenta o pH da urina (>6,5) pela ingestão de citrato de potássio ou bicarbonato de sódio (GETTMAN; SEGURA, 1999; HARBAR *et al.*, 1986).

A nefrolitíase é um mal que atinge considerável parcela da população, ocasionando dor e desconforto aos pacientes bem como afetando financeiramente os setores público e privado. Tendo em vista que as formas de tratamento para esta patologia ainda não estão bem definidas quanto ao custo-benefício e eficácia, a busca por fármacos de origem natural torna-se importante no cenário mundial. Neste sentido a *Copaifera langsdorffii* vem se destacando, já que existem relatos envolvendo o uso do chá de suas folhas para amenizar cólicas renais.

Portanto, desenvolver estudos visando conhecer efetivamente a composição química destas folhas bem como suas propriedades antilitiásicas tornam-se imprescindíveis na busca de um novo fitoterápico.

1.3 Produtos naturais no tratamento da nefrolitíase

Diferentes recursos naturais vêm sendo empregados para tratar cálculos renais. Em sistemas tradicionais de medicina, grande parte desses recursos é obtida de plantas e comprovada ser útil no tratamento da nefrolitíase. No entanto, a racionalidade do uso não está bem estabelecida, ou seja, estudos farmacológicos e clínicos encontram-se inconclusivos ou ainda não foram realizados (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007). Nesse contexto, uma avaliação crítica destas plantas assume grande importância.

Singh e Sachan (1989) avaliaram em estudos farmacológicos e clínicos uma formulação composta por cinco ervas: *Desmostachya bipinnata*, *Saccharum officinarum*, *Saccharum nunja*, *Saccharum spontaneum* e *Imperata cylindrica*. Esta formulação demonstrou eficácia tanto profilática, prevenindo a formação, como terapêutica, dissolvendo cálculos pré-formados em ratos albinos. A atividade antilitiásica foi atribuída ao efeito diurético das ervas.

As cascas de *Crataeva nurvala* têm sido extensivamente estudadas por pesquisadores da Índia. Lupeol, um triterpeno isolado desta espécie, apresentou atividades profiláticas e curativas relacionadas à dose em ratos albinos (ANAND; PATNAIK; KULSHRESHTHA, 1994).

A atividade antilitiásica de compostos derivados de isoflavonas, isolados de *Eysenhardtia polystachya*, foi estudada em ratos, observando-se uma significativa

redução no tamanho das pedras nos animais tratados com os compostos em questão (PEREZ *et al.*, 2000).

Sannidi e colaboradores (1997) avaliaram a atividade de uma combinação contendo *Bergenia ligulata* e *Tribulus terrestris* em 14 pacientes com cálculo renal e 16 com cálculo no ureter. 28,57% dos pacientes com cálculo renal e 75% com cálculo no ureter eliminaram-nos completamente, enquanto que nos demais pacientes houveram expulsão parcial dos cálculos e alteração em seu formato e tamanho.

Costus spiralis é extensivamente utilizada na medicina tradicional brasileira para eliminação de pedras no rim. Seu extrato aquoso, quando administrado nas doses de 0,25 e 0,5 g/kg/dia durante quatro semanas, reduz significativamente o crescimento de cálculos de oxalato de cálcio em bexiga de ratos (VIEL *et al.*, 1994).

Pesquisas realizadas com raízes de *Rubia tinctorum* permitiram verificar sua eficácia na eliminação de cálculos de oxalato, fosfato, carbonato de cálcio e ácido úrico. Esta atividade foi atribuída à presença de hidróxi-antraquinonas, as quais estimulam o músculo liso da bexiga e permitem que os cálculos sejam expelidos (SCHNEIDER *et al.*, 1979).

Bensatal e Ouahrani (2008) verificaram que a fração ácida de *Tamarix gallica* L apresenta importante efeito inibitório na cristalização do oxalato de cálcio *in vitro*. Este fenômeno parece estar relacionado às funções ácidas de seus compostos, que podem complexar-se com íons de cálcio.

A avaliação do efeito profilático de sementes de *Trigonella foenum graecum* L na formação de pedras nos rins de ratos permitiu a confirmação do uso popular da planta quanto as suas propriedades antilitiásicas. Sugere-se que o extrato seja capaz de manter as partículas de oxalato de cálcio dispersas na solução e assim

permitir que sejam eliminadas facilmente do rim. Além disso, seu mecanismo de ação parece estar também relacionado ao aumento da diurese e à atividade antioxidante do extrato devido à presença de flavonóides (LAROUBI *et al.*, 2007).

Além dos extratos, um produto frequentemente utilizado por pacientes litíasicos é o Rowatinex[®], uma mistura de óleos essenciais contendo pineno (31%), canfeno (15%), borneol (10%), anetol (4%), fenchona (4%) e cineol (3%). Verificou-se em estudos preliminares que parece existir certo efeito benéfico do Rowatinex[®], por aumentar a excreção de glucuronídeos, os quais poderiam reduzir a cristalização do oxalato de cálcio e exercer algum benefício em acelerar a passagem do cálculo na crise de cólica aguda (WILL *et al.*, 1981).

Embora intensa pesquisa esteja sendo realizada a fim de estabelecer os mecanismos de formação dos cálculos, o papel da dieta e o potencial de plantas e de outros agentes no tratamento da nefrolitíase, ainda não existe um fármaco padrão disponível. As principais dificuldades em desenvolvê-lo correspondem à natureza multifatorial da doença, às diferentes disfunções bioquímicas que levam a ela e às diferentes variedades químicas dos cálculos (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007).

Os produtos naturais e seus derivados poderão contribuir não somente no desenvolvimento de uma nova forma de tratamento, mas também, certamente, na redução da taxa de incidência dos cálculos renais (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007).

1.4 O gênero *Copaifera*

As plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* (Fabaceae, caesalpinoideae) são nativas de regiões tropicais da América Latina e da África Ocidental. Conhecidas no Brasil como copaibeiras, e popularmente como pau d'óleo, estas árvores encontram-se amplamente distribuídas na Amazônia e regiões centrais do Brasil. São árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Segundo a última edição do Index Kewensis (1996), o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas somente são encontradas no Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (MORS; RIZZINI, 1966; PIO CORRÊA, 1931).

As copaibeiras exudam do seu tronco um óleo resinoso chamado óleo de copaíba, também descrito como bálsamo de copaíba (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). No entanto, a designação correta é a de óleo-resina, por ser um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (BRUNETON, 1987).

A produção do óleo-resina pode variar entre as espécies, sendo a *C. reticulata*, *C. guianensis*, *C. multijuga* e *C. officinalis* as espécies botânicas mais frequentemente empregadas para esse fim (LAWRENCE, 1980).

Sua utilização como agente antiinflamatório e cicatrizante é reportada desde o século XVI, quando os primeiros colonizadores das Américas relataram que as índias aplicavam este óleo no umbigo dos recém-nascidos e os guerreiros em seus ferimentos após batalhas (SALVADOR, 1975).

Atualmente, as aplicações medicinais do óleo de copaíba atingem todas as regiões do Brasil, sendo administrado oralmente ou por aplicação tópica (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). Na região Amazônica seu uso é bastante extenso, tal que a copaíba destaca-se como a planta medicinal mais utilizada e conhecida da população (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Dentre as diversas propriedades farmacológicas do óleo, destacam-se as atividades antinociceptiva (GOMES *et al.*, 2007), antiinflamatória (PAIVA *et al.*, 2002a) e antiulcerogênica (PAIVA *et al.*, 1998).

Quanto à composição química dos óleos de copaíba, esta consiste de misturas de sesquiterpenos e diterpenos. Entre os sesquiterpenos encontrados, α -copaeno, β -cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno e δ e γ -cadineno foram descritos em grande parte dos óleos estudados, enquanto os diterpenos apresentam os esqueletos caurano, labdano e clerodano. O ácido copálico, um diterpeno ácido, foi o único encontrado em todos os óleos já analisados, podendo desta forma ser usado como um biomarcador dos óleos de copaíba (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

1.5 *Copaifera langsdorffii* Desf.

Conhecida por diversos nomes de acordo com as regiões onde se encontra, a espécie mais comum fora da Região Amazônica é a *Copaifera langsdorffii* Desf.

(Figura 1). Óleo-pardo (BA, RJ, SP), capaúba (MS), coopaíba (MG), copaibeira (SP) são algumas das denominações que recebe (BRAGA, 1960).

Diferentemente das outras espécies, as quais produzem óleo-resina com coloração que varia do amarelo para o marrom, na *C. langsdorffii* em particular o óleo apresenta-se avermelhado (MATTOS FILHO *et al.*, 1993). Estudos fitoquímicos deste óleo-resina demonstraram presença de óleos essenciais (8%; β -cariofileno, óxido cariofileno, β -elemano, α -cis-bergamoteno, ar-curcumeno e α -trans-bergamoteno) e uma mistura de diterpenos (70%; ácidos caurenóico e poliáltico) (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Paiva *et al.* (2002b) confirmaram o efeito benéfico do óleo-resina de *C. langsdorffii* na cicatrização, justificando seu uso tradicional no tratamento de feridas. Estes mesmos autores (Paiva *et al.*, 2004) demonstraram o efeito protetor deste óleo-resina contra colite aguda induzida por ácido acético em ratos.

O principal diterpeno isolado, o ácido caurenóico, apresentou efeitos diurético, antiinflamatório e vasodilatador em roedores (SOMOVA *et al.*, 2001; PAIVA *et al.*, 2002; TIRAPELLI *et al.*, 2004).

Por possuir um óleo-resina de grande valor terapêutico, a *Copaifera* vem sendo amplamente utilizada na medicina tradicional. Seu uso popular motivou diversos grupos de pesquisa a estudar este gênero, de forma que diferentes atividades biológicas foram e vem sendo avaliadas. No entanto, pouco se conhece sobre a fitoquímica e a atividade antitumoral das partes aéreas de *C. langsdorffii*.

Portanto, considerando o grande potencial desta espécie, no presente trabalho propõe-se o estudo fitoquímico de *C. langsdorffii*, bem como a identificação dos prováveis princípios ativos responsáveis pela atividade biológica em questão,

objetivando, desta forma, fornecer bases para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico.

Figura 1: *Copaifera langsdorffii*. (A) Foto panorâmica; (B) tronco; (C) ramo com folhas e flores; (D) sementes e frutos.

2. Objetivos

Geral

Investigar o potencial das folhas e ramos de *Copaifera langsdorffii* para o desenvolvimento de novo fitoterápico para o tratamento da nefrolitíase.

Específicos

- Obter extrato hidroalcoólico das folhas e ramos de *Copaifera langsdorffii*, bem como suas respectivas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila;
- Isolar os metabólitos majoritários do extrato por meio da utilização de diferentes modalidades cromatográficas;
- Realizar estudos de eficácia pré-clínica antilitiásica *in vivo* por meio da inserção de pastilhas de oxalato de cálcio na bexiga de ratos e posterior tratamento com extrato bruto liofilizado.

3. Materiais e métodos

3.1 Informações gerais referentes aos materiais utilizados

O grau de pureza dos solventes utilizados variou de acordo com cada finalidade. Nas extrações, partições e sistemas cromatográficos básicos foram utilizados solventes de grau P.A., das marcas *Merck* e *Synth* e grau técnico previamente submetido à destilação fracionada. Para as separações por cromatografia de fase líquida de alta eficiência foram utilizados solventes de grau cromatográfico das marcas *Mallinckrodt* e *J.T. Baker*.

As características das fases estacionárias que foram utilizadas nos processos cromatográficos variaram de acordo com a modalidade desejada:

- Cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC): utilizou-se como adsorvente silicagel 60 GF₂₅₄ *Merck* (art 107730), com espessura de aproximadamente 0,25 mm;
- Cromatografia em coluna clássica (CC): foi utilizado como adsorvente silicagel 60 230-400 mesh *Merck* (art. 1093851000).

Para as revelações dos perfis cromatográficos obtidos por meio de placas comparativas foram utilizados vapores de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico, solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm).

3.2 Material vegetal: coleta, identificação, estabilização e moagem

O material vegetal utilizado na obtenção do extrato bruto foi coletado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, no fim do mês de

agosto de 2007. As exsicatas da espécie foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo (Departamento de Biologia – FFCLRP) e depositadas no herbário dessa mesma instituição sob o código SPFR 10120. As porções coletadas corresponderam às partes aéreas da planta, ou seja, folhas e ramos.

Após a coleta, o material vegetal foi seco e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40 °C (modelo 170 N° 370/82 Soc. Fabre LTDA) e, em seguida, foi submetido à moagem em moinho de facas previamente esterilizado.

3.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico

O pó obtido após a moagem do material vegetal (3100 g) foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica na proporção 7:3, seguida de percolação, por três vezes a cada 72 horas. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas, transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e concentradas sob pressão reduzida com auxílio de rotaevaporador e banho de aquecimento funcionando com temperatura de 50 ± 10 °C. O extrato resultante foi transferido para frasco previamente pesado, permitindo assim o cálculo da diferença gravimétrica. Foram obtidos 520 g de extrato bruto das partes aéreas de *C. langsdorffii*, equivalente a 16,8% de rendimento.

3.4 Fracionamento do extrato bruto de *C. langsdorffii* por meio de partição líquido-líquido

O extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii* (EBC) foi submetido à partição com solventes orgânicos com a finalidade de separar seus constituintes. Neste

procedimento, uma alíquota do extrato (100 g) foi solubilizada em 1000 mL de metanol-água (9:1 v/v), transferida para funil de separação e extraída por três vezes com 400 mL de hexano pelo procedimento de partição líquido-líquido. À fração resultante, denominada hexânica, foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação de água. Em seguida, esta foi filtrada para balão de fundo redondo e concentrada sob pressão reduzida a 40 °C com auxílio de rotaevaporador. Depois de concentrada, a fração hexânica foi transferida para frasco previamente pesado e a diferença gravimétrica foi calculada.

A solução hidrometanólica restante foi rotaevaporada com o objetivo de eliminar o metanol. Em seguida, foram adicionados 600 mL de água destilada na solução aquosa remanescente e realizou-se o mesmo procedimento de partição descrito com hexano, porém utilizando-se os solventes diclorometano e acetato de etila, em sequência. Os dados de rendimento de cada fração são apresentados na tabela 1 e o processo de fracionamento do extrato está resumido no esquema 1.

Tabela 1: Rendimentos de cada fração obtida por processo de partição.

Extrato bruto – EBC (100 g)		
Rendimento 16,8% m/m		
Frações	Quantidade obtida	Rendimento
Hexânica (EBCH)	4,34 g	4,34%
Diclorometânica(EBDCM)	2,16 g	2,16%
Acetato de etila (EBCA)	34,00 g	34,00%
Aquosa (EBCAq)	57,40 g	57,40%

Esquema 1: Procedimento de fracionamento do extrato bruto de *C. langsdorffii* (EBC).

3.5 Determinação do perfil cromatográfico do extrato bruto de *C. langsdorffii* utilizando CLAE

A análise preliminar do extrato bruto de *C. langsdorffii* (EBC) foi realizada em cromatógrafo da marca Shimadzu composto por três bombas Shimadzu LC-10AD,

detector espectrofotométrico com arranjo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M10A_{VP}, sistema controlador SCL-10A_{VP} conectado a um computador com software Shimadzu Class-VP versão 5.02, injetor automático (SIL-10AD_{VP}) e coletor de frações FRC-10A. Utilizou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,6 mm x 250 mm, diâmetro das partículas de 5 µm e pré-coluna analítica de fase reversa C₁₈ SGE. Empregou-se sistema de eluição por gradiente, iniciando-se com a mistura de 20% de metanol em 80% de água e terminando com 100% de metanol em 30 minutos (vazão de 1,0 mL/min). A amostra desse extrato foi solubilizada em metanol na concentração de 1 mg/mL, filtrada através de membrana de celulose de 0,45 µm e uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema cromatográfico.

3.6 Caracterização química preliminar das frações EBCH, EBCDCM e EBCA

A caracterização química das frações EBCH, EBCDCM e EBCA foi realizada por meio de cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM), determinação dos índices de retenção, estudo comparativo com banco de dados da biblioteca Wiley e com dados da literatura. Todas as frações foram preparadas na concentração de 1 mg/mL e solubilizadas em solvente orgânico.

Para a realização desta metodologia foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa da marca Shimadzu – QP 2010 equipado com injetor automático AOC – 20Si operando no modo “split” (1:100), acoplado a um detector seletivo de massas. A aquisição dos resultados foi realizada com o auxílio do sistema de dados Shimadzu e biblioteca de espectro de massas Wiley 7.0. Para as análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Utilizou-se

hidrogênio como gás de arraste (1,30 mL/min) e os espectros de massas foram obtidos no modo impacto eletrônico a 70 eV, com escala de massas variando entre 40-500 m/z . A temperatura do injetor foi de 250 °C e a programação de aquecimento para o forno foi de 60-240 °C com velocidade de aquecimento de 3 °C/min e com tempo total de análise de 60 minutos. Os cromatogramas contendo dados, tais como tempos de retenção e percentual relativo, foram obtidos injetando-se 1 µL de cada amostra.

Os constituintes presentes nas frações foram identificados comparando-se seus índices de retenção, os quais foram obtidos com o auxílio de uma série homóloga de padrões de n -alcanos (C_9 - C_{22}), com aqueles encontrados na literatura, bem como pela comparação de seus espectros de massas com aqueles divulgados na literatura ou disponíveis no sistema de dados da biblioteca Wiley 7.0 (ADAMS, 2001). Para o cálculo dos índices de retenção foi utilizada a equação descrita por Clement, 1990.

$$IR = \left\{ \frac{[(tr_x - tr_{cn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \cdot 100]}{(tr_{cn} - tr_{cn-1})} \right\} + 100 \cdot C_{n-1}; \text{ (CLEMENT, 1990)}$$

Em que:

tr_x : tempo de retenção do analito;

tr_{cn} : tempo de retenção do n -alcano posterior ao analito;

tr_{cn-1} : tempo de retenção do n -alcano anterior ao analito;

C_n : número de carbono do n -alcano posterior;

C_{n-1} : número de carbono do n -alcano anterior.

3.7 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *C. langsdorffii*

Com o objetivo de realizar o isolamento de constituintes químicos para servirem como padrões cromatográficos e para realização de ensaios biológicos, o extrato bruto de *C. langsdorffii* (EBC) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna clássica. Para isso, cerca de 6 g do extrato foram aplicados em uma coluna de vidro de 5,5 cm de diâmetro interno e 70 cm de altura, empacotada com 600 g de silicagel, correspondendo a 35 cm de altura da fase estacionária. A fase móvel utilizada nesse procedimento corresponde ao gradiente de polaridade mostrado na tabela 2, iniciando-se com hexano e finalizando com a limpeza da fase estacionária utilizando metanol/água na proporção de 1:1. Durante a realização deste método, amostras com volume de 200 mL foram coletadas e numeradas (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências de eluições realizadas no processo de fracionamento.

Extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i> - EBC (6 g)			
Sequência 1	Sequência 2	Sequência 3	Sequência 4
Hexano	Acetato de etila	Etanol	Metanol
1-6	130-195	248-268	269-275
Hex/acet 95:5	Acet/etanol 95:5		Metanol/água
7-21	196-202		276-295
Hex/acet 9:1	Acet/etanol 9:1		
22-39	203-209		
Hex/acet 85:15	Acet/etanol 85:15		
40-54	210-223		
Hex/acet 8:2	Acet/etanol 8:2		
55-67	224-230		
Hex/acet 7:3	Acet/etanol 75:25		
68-80	231-237		
Hex/acet 6:4	Acet/etanol 7:3		
81-99	238-240		
Hex/acet 1:1	Acet/etanol 6:4		
100-114	241-247		
Hex/acet 3:7			
115-129			

3.8 Fracionamento da fração em acetato de etila (EBCA) por coluna clássica

Visando a obtenção de novas substâncias ou frações ricas em componentes de interesse, optou-se por realizar um novo procedimento de separação. Para isso, cerca de 8 g da fração EBCA liofilizada foi solubilizada em 50 mL de acetato de etila e aplicada em uma coluna de vidro de 6,5 cm de diâmetro interno e 100 cm de altura, empacotada com silicagel, na proporção de 1:125. A fase estacionária compactada mediu 75 cm de altura. Foram coletadas 50 frações com volume de 1 L

cada e o sistema de eluição de solventes foi realizado como apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Fracionamento da fração EBCA por coluna clássica.

Fase móvel	Proporção	Subfrações
AcOEt	100	1-6
AcOEt/MeOH	9:1	7-9
AcOEt/MeOH	8:2	10-15
AcOEt/MeOH	7:3	16-22
AcOEt/MeOH	1:1	23-29
MeOH	100	30-41
MeOH/ácido acético	10:1	42-50

3.9 Purificação de subfração obtida a partir do fracionamento da fração EBCA por coluna clássica

Após o fracionamento da fração EBCA por coluna clássica, as subfrações obtidas foram submetidas à análise por CLAE utilizando-se o mesmo aparelho e condições descritos no item 2.5. A partir desse procedimento, verificou-se que uma das subfrações apresentava grande potencial visto que, além de possuir quantidade razoável de massa, era rica em apenas dois componentes. Sendo assim, optou-se por purificar essa subfração por meio de CLAE em modo semipreparativo. Para tanto, foi utilizado cromatógrafo de marca Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-6A, detector espectrofotométrico UV/VIS Shimadzu SPD-6AV, sistema controlador SCL-10A_{VP}, conectado a um computador com software Shimadzu Class-VP versão 5.02 e injetor automático SIL-10AD_{VP}. Utilizou-se coluna cromatográfica semipreparativa de fase reversa CLC-ODS (M) – Shimadzu, 10 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 µm e pré-coluna de fase reversa C₁₈ fabricada pela mesma companhia. Este aparelho (Figura 2) encontra-se instalado no Laboratório de

Química Orgânica da FCFRP-USP e foi gentilmente disponibilizado pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Após a avaliação de alguns sistemas de solvente, empregou-se sistema de eluição por gradiente, iniciando-se com a mistura de 40% de metanol em 60% de água e terminando com 100% de metanol em 40 minutos (vazão de 6,0 mL/min). A subfração foi solubilizada em metanol na concentração de 10 mg/mL e uma alíquota de 2 mL foi injetada no sistema cromatográfico. A injeção da amostra no sistema cromatográfico seguida da coleta de picos foi realizada diversas vezes a fim de isolar os componentes presentes na subfração.

Figura 2: Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência.

3.10 Identificação estrutural das substâncias isoladas

As estruturas químicas dos metabólitos isolados e purificados foram elucidadas utilizando-se o método espectroscópico de ressonância magnética

nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C e a espectrometria de massas (EM). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetro Bruker–Advance DRX₅₀₀, operando em 400 MHz (RMN de ^1H) e 100 MHz (RMN de ^{13}C), empregando-se solventes deuterados da marca *Aldrich*. Para a obtenção das massas das substâncias, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas com ionização por “electrospray” no modo negativo (espectrômetro de massas ESI-TOF, Bruker Daltonics). As amostras foram diluídas em solução de metanol/água 8:2, injetadas e eluídas com vazão de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.11 Estudo de eficácia pré-clínica antilitiásica do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* em animais

3.11.1 Animais

No experimento foram utilizados ratos machos e adultos do tipo Wistar. Os animais foram adquiridos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia – CEDEME/Unifesp e aclimatados no biotério da Disciplina de Nefrologia da mesma Universidade. Foram mantidos em gaiolas contendo cinco animais/gaiola, com ração sólida comercial e água servidas à vontade. Para a coleta de urina de 24 horas os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso à ração e água.

3.11.2 Pastilhas de oxalato de cálcio (CaOx)

Pastilhas de CaOx, de aproximadamente 4 mm de diâmetro, serviram como nicho (corpo estranho) para o crescimento do cálculo vesical. Elas foram preparadas da seguinte forma: 19,92 g de $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ (oxalato de potássio monoidratado) e 23,34 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (cloreto de cálcio diidratado), correspondendo a 0,4 M de cada sal, foram diluídos separadamente em 300 mL de água deionizada e colocados em gotejamento constante, durante duas horas, na velocidade de 17 gotas por minuto, em 200 mL de água deionizada pré-aquecida a 75 °C, sob agitação e temperatura constantes. Após duas horas de gotejamento, a solução permaneceu por mais cinco horas sob agitação e temperatura (75 °C) constantes. Em seguida, iniciou-se o processo de lavagem (8 a 10 vezes) para a retirada total de cloreto de potássio da solução, irrigando com 200 mL de água deionizada e aspirando com pipeta de Pasteur após a precipitação. Nas últimas lavagens, 1 mL de álcool foi adicionado aos 200 mL de água para maior agregação do soluto. Depois disso, o precipitado de CaOx foi transferido para um béquer coberto com papel laminado e levado para uma estufa a 37 °C, permanecendo assim por uma ou duas semanas. Por fim, a pasta foi transferida para um molde apropriado, embrulhado com papel laminado e levado à estufa a 37 °C, por 24 horas, formando as pastilhas (Figura 3), que foram pesadas e esterilizadas antes da utilização.

Figura 3: Pastilha de oxalato de cálcio.

3.11.3 Protocolo experimental

3.11.3.1 Introdução das pastilhas

A introdução da pastilha de CaOx foi feita na bexiga dos animais, sob anestesia com solução de ketamina/xilazina (2:1 v/v), na dose de 0,1 mL/100 g de massa corpórea, via intramuscular. Após tricotomia e assepsia local, foi feita uma incisão suprapúbica na parede abdominal, com cerca de três centímetros de extensão, observando-se uma distância de dois centímetros do meato uretral. Em seguida, a incisão foi feita em plano muscular. Afastaram-se então as estruturas da parede e a bexiga foi exposta, com posterior incisão e introdução da pastilha de CaOx. Suturou-se a parede vesical com o fio Mononylon 6.0 (Ethicon, agulha de 2,0 cm) com dois pontos simples. Posteriormente, o peritônio, plano muscular e pele foram suturados com o fio Mononylon 3-O (Ethicon, 3/8 agulha circular) em ponto simples.

Após a cirurgia os animais foram acomodados em gaiolas individuais e mantidos sob observação durante 24 horas. Em seguida, foram transferidos para as gaiolas comuns, com cinco animais/gaiola, respeitando os grupos a que pertenciam.

Figura 4: Cirurgia para introdução da pastilha.

3.11.3.2 Padronização do modelo de corpo estranho para tratamento com *C. langsdorffii*

A fim de determinar o início do tratamento com determinado extrato ou substância, Barros (2006) realizou um experimento piloto. Neste, três animais foram submetidos ao processo cirúrgico de introdução da pastilha de CaOx na bexiga e sacrificados 25, 30 e 35 dias após a cirurgia. Observou-se a presença de pequenos satélites após 25 dias, enquanto que após 30 ou 35 dias os cálculos estavam bem estabelecidos, incluindo a ocorrência de satélites. Desta forma, foi então escolhido o período de 30 dias após a cirurgia como base para o início do tratamento.

3.11.3.3 Administração do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*

O extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*, preparado como previamente descrito, foi liofilizado e administrado por gavagem na dose de 5 mg/rato/dia, diluído em 1 mL de água, durante 18 dias, aos grupos experimentais B e D. Esta dosagem foi adotada baseando-se em estudos realizados com a *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) utilizando este protocolo (BARROS *et al.*, 2006), nos quais a dose foi calculada a partir da preconizada em seres humanos (NISHIURA *et al.*, 2004).

3.11.4 Grupos experimentais

Controle (grupo A, $n = 5$) – Animais sem tratamento mantidos no biotério por 48 dias.

Controle + CI (grupo B, $n = 5$) – Animais mantidos no biotério por 48 dias, sendo que nos últimos 18 dias foram tratados com *C. langsdorffii*.

Corpo estranho (grupo C, $n = 4$) – Animais nos quais a pastilha de CaOx foi introduzida na bexiga; estes foram avaliados 48 dias após a cirurgia.

Corpo estranho + CI (grupo D, $n = 5$) – Animais nos quais a pastilha de CaOx foi introduzida na bexiga e que foram tratados com *C. langsdorffii* após 30 dias de cirurgia, quando o cálculo já havia se estabelecido. Estes animais foram avaliados 48 dias após a cirurgia, ou seja, com 18 dias de tratamento.

3.11.5 Análises

3.11.5.1 Análises bioquímicas

A urina de 24 horas foi coletada em gaiola metabólica no início e no fim do protocolo de cada grupo. Durante este período, os animais tiveram livre acesso à água e ração. Volume urinário, excreção urinária de sódio e potássio (fotômetro de chama B462 - Micronal) e creatinina (kit específico LABTEST Diagnostics) foram analisados após este procedimento.

Ao final do protocolo de cada grupo e após a coleta da urina de 24 horas, os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina (2:1 v/v), na dose de 0,1 mL/100 g de massa corpórea, via intramuscular. Em seguida, o sangue foi coletado da aorta abdominal para a dosagem da concentração sérica de sódio e potássio (fotômetro de chama B462 - Micronal) e creatinina (kit específico LABTEST Diagnostics). Após a coleta sanguínea os animais foram sacrificados.

3.11.5.2 Obtenção dos cálculos

Após a coleta de sangue, foi feita uma incisão na bexiga para a retirada dos cálculos, os quais posteriormente foram lavados com água destilada, secos em estufa a 40 °C e pesados. Adicionalmente, foi medida a dureza dos cálculos empregando-se um durômetro (Nova Ética).

3.11.5.3 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa SigmaStat® 2.0. Para analisar as diferenças entre as amostras do início e final do tratamento foi utilizado o teste “t Student” pareado. Para analisar as diferenças entre as amostras dos diferentes grupos experimentais foi utilizado o teste “t Student”, complementado pelo teste Mann-Whitney Rank Sum quando apropriado. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *C. langsdorffii* (EBC)

Anterior ao fracionamento cromatográfico de EBC, as frações EBCH, EBCDCM e EBCA, obtidas por meio de partição líquido-líquido, foram quimicamente caracterizadas empregando a cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Este método, além de permitir a separação dos constituintes, fornece ainda um espectro de massas para cada pico, contribuindo, desta forma, para a identificação dos componentes da amostra.

Nas frações EBCH e EBCDCM foram encontrados basicamente compostos derivados dos ácidos palmítico, linoleico e linolênico, enquanto que na fração EBCA verificou-se a presença de compostos fenólicos. Estas observações iniciais sugerem que, aparentemente, a composição de EBC é bastante diferente da do óleo-resina, o qual é composto principalmente por terpenos. No entanto, devido aos elevados níveis de temperatura de trabalho dessa técnica, normalmente acima de 200 °C, pode ter havido degradação de diterpenos ácidos no injetor.

Assim, a fim de complementar essa caracterização prévia, foi realizado um estudo preliminar de EBC empregando a cromatografia de fase líquida de alta eficiência (CLAE). Por meio da metodologia descrita no item 2.5, o perfil cromatográfico de EBC foi obtido (Figura 5).

Figura 5: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *C. langsdorffii* (EBC) obtido por CLAE em 257 nm.

A partir do cromatograma, observou-se a presença de compostos polares capazes de absorver luz UV. No entanto, diante do fato de que há componentes que não possuem grupos cromóforos, outras substâncias poderiam estar presentes no extrato. Desta forma, considerando-se a provável presença de compostos que não absorvem luz UV, aliada a possibilidade de degradação de alguns compostos no injetor do cromatógrafo a gás, optou-se por realizar o fracionamento de EBC por meio de cromatografia em coluna clássica.

Durante esse procedimento, todas as subfrações coletadas foram analisadas e reunidas com base nos perfis obtidos por CCDC. Com relação às subfrações obtidas por eluição com solventes ou mistura de solventes mais apolares, estas apresentaram características oleosas, não sendo possível obter um componente na forma de cristais. Este resultado, portanto, confirma as evidências observadas na caracterização prévia das frações EBCH e EBCDCM por CG-EM.

O fracionamento empregando acetato de etila como eluente levou à obtenção de 65 subfrações (130 a 195). Com base nos perfis obtidos por CCDC, estas

subfrações foram reunidas em uma única fração e submetidas ao processo de recristalização, utilizando acetona como solvente e temperatura de 50 °C. Por meio desse procedimento, foram obtidos 150 mg de um sólido de coloração amarela, o qual recebeu o código JPA3.

Apesar da realização do fracionamento em coluna clássica, as demais frações resultantes mostraram-se bastante complexas. Contudo, foi observado que alguns compostos presentes nestas frações absorviam luz UV em 254 e 366 nm, indicando a presença de grupos cromóforos.

Assim, tendo em vista que as subfrações obtidas por eluição com solventes apolares não apresentaram compostos de interesse e, adicionalmente, alguns constituintes foram detectados utilizando-se solventes de média polaridade ou polares, afirma-se, previamente, que o extrato das folhas de *C. langsdorffii* apresenta como componentes majoritários substâncias relativamente polares. Além disso, sugere-se que estas substâncias possuem grupos cromóforos, como as ligações π e anéis aromáticos. Tais características são comumente observadas na classe dos flavonóides e ácidos fenólicos.

Desta forma, comparando os dados da literatura com os obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a composição química do extrato das folhas de *C. langsdorffii* é bastante diferente da do óleo-resina, a qual é constituída majoritariamente por terpenos. Assim, com o objetivo de definir quimicamente esse extrato, o estudo passou a ser direcionado ao isolamento de compostos de maior polaridade, os quais poderiam ser encontrados nas frações acetato de etila e aquosa.

4.2 Fracionamento da fração em acetato de etila (EBCA) por coluna clássica

O trabalho minucioso realizado com o extrato bruto permitiu concluir que o estudo fitoquímico deveria estar concentrado na obtenção de compostos polares. Considerando-se que o extrato bruto de copaíba (EBC) é constituído por aproximadamente 58% de componentes hidrossolúveis, buscou-se, primeiramente, um método que permitisse o fracionamento da fração aquosa. Devido à dificuldade de separar substâncias polares em fase normal, empregou-se a CLAE no modo semipreparativo.

Na figura 6 apresenta-se o cromatograma da fração EBCAq, o qual foi utilizado para monitorar a coleta das frações.

Figura 6: Cromatograma da fração EBCAq obtido em CLAE no modo semipreparativo utilizado para monitorar a coleta das frações.

Analisando a figura 6, pode-se observar a presença de 17 picos mais resolvidos e de três conjuntos de frações mais complexas (*). Todas as subfrações correspondentes aos picos foram coletadas, bem como os conjuntos de subfrações, os quais, posteriormente, seriam submetidos a uma nova etapa de purificação. Em

seguida, as subfrações obtidas foram liofilizadas e analisadas em CLAE no modo analítico. Surpreendentemente, as subfrações coletadas não se mostraram puras ou com grau de pureza satisfatório, possivelmente em consequência da complexidade da composição da fração EBCAq e semelhança de polaridades de seus componentes. Sendo assim, o estudo sobre a composição da fração EBCAq ainda não foi concluído. Métodos mais avançados, tais como a utilização do HSCCC (High-Speed Countercurrent Chromatography) e métodos de detecção de alta resolução deverão ser propostos a fim de obter informações mais precisas sobre essa fração.

Assim, a fim de dar continuidade ao processo de isolamento de compostos polares, foi realizado o fracionamento da fração EBCA em coluna clássica. Tal procedimento permitiu a obtenção de 796,6 mg da subfração apresentada no cromatograma a seguir (Figura 7):

Figura 7: Análise em CLAE (281 nm) da fração obtida por fracionamento da fração EBCA em coluna clássica.

Posteriormente, essa subfração foi purificada empregando-se CLAE no modo semipreparativo sob as condições descritas no item 2.9. Como resultado, foram isoladas duas substâncias: JPA3 (esta já isolada anteriormente) e JPA4.

O direcionamento do estudo às frações EBCA e EBCAq permitiu a obtenção de conclusões adicionais em relação à composição de EBC. Observando-se a fração EBCAq isoladamente, verificou-se uma grande variedade de componentes, porém de difícil isolamento, indicando uma provável baixa concentração deles na fração EBCAq e conseqüentemente em EBC. Já o fracionamento da fração EBCA em coluna clássica permitiu a obtenção de dois componentes, os quais estavam presentes de forma majoritária na fração EBCA e certamente em EBC também.

Aliando as observações acima mencionadas ao fato de que EBC é constituído basicamente de compostos polares, os quais estão presentes nas frações EBCAq e EBCA, verificou-se que o cromatograma de EBC poderia ser dividido em duas regiões: **A**, referente à porção mais polar do extrato, aquela que contém os componentes da fração EBCAq e **B**, referente à porção menos polar e que contém os componentes da fração EBCA, ou seja, as substâncias JPA3 e JPA4. Sabendo-se que a porção aquosa do extrato é rica em compostos, os quais no entanto são minoritários, pode-se concluir que JPA3 e JPA4 são os componentes principais de EBC.

Figura 8: Perfil cromatográfico de EBC obtido por CLAE dividido em duas regiões: **A**, referente à porção que contém os componentes presentes na fração EBCAq e **B**, referente à porção que contém as substâncias JPA3 e JPA4.

4.3 Elucidação estrutural das substâncias JPA3 e JPA4

A elucidação estrutural dos flavonóis quercetrina (quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo) e canferol 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (Figura 9) foi realizada com base no espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e ESI-EM das substâncias JPA3 e JPA4 (Tabelas 4 e 5; Anexos 7.6 e 7.7) e comparação destes dados com a literatura (MARKHAM *et al.*, 1978; AGRAWAL, 1989; LHUILLIER *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2008; NUGROHO *et al.*, 2009).

Figura 9: Estruturas químicas dos flavonóis quercetrina (JPA3) e canferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (JPA4) isoladas do extrato bruto de partes aéreas de *C. langsdorffii*.

Analisando-se o espectro de RMN de ^1H da substância JPA3, nota-se a presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,20 (d, $J = 1,9$, 1H) e 6,38 (d, $J = 1,9$, 1H) com constantes de acoplamento de hidrogênios meta correlacionados, típicos de flavonóides com anel A substituídos nas posições 5 e 7. Neste espectro, verifica-se também a presença de sinais de hidrogênios relativos ao anel B em δ_{H} 6,91 (d, $J = 8,29$, 1H), 7,31 (dd, $J = 8,29$ e 1,99, 1H) e 7,34 (d, $J = 1,99$, 1H). Estas constantes de acoplamento são relativas a hidrogênios orto e meta correlacionados, indicando que o anel B pode estar substituído nas posições 3'/4', 2'/4', 4'/5' ou 4'/6'.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C da substância JPA3 e a comparação com dados da literatura, foram verificados deslocamentos químicos típicos da quercetina. Sendo assim, os sinais em δ_{C} 146,32 e 149,70 observados no

espectro correspondem, respectivamente, a C-3' e C-4', e conseqüentemente, a substituição do anel B é em 3'e 4'.

Considerando-se ainda o espectro de RMN de ^{13}C da substância JPA3, são observados 21 sinais de carbono, sendo 15 atribuídos ao flavonol quercetina. Associando estas informações às obtidas no espectro de RMN de ^1H , conclui-se que estes sinais remanescentes referem-se a um açúcar.

Segundo Markham e colaboradores (1978), a glicosilação na posição 3 de um flavonol parecer exercer um efeito mais acentuado no C-2 da aglicona (orto em relação a C-3) do que a glicosilação em outras posições. Como exemplo, pode-se citar que, enquanto a glicosilação do C-5 reduz o δ_c do C-2 em cerca de 3 ppm, a ligação de um açúcar no C-3 pode aumentar o δ_c do C-2 até acima de 9 ppm. Assim, sabendo-se que o δ_c do C-2 da quercetina, aglicona da quercetrina, é de aproximadamente 146,9 ppm e que o obtido para JPA3 é de 158,41 ppm, confirma-se que ocorre uma 3-O-glicosilação. Além disso, a partir do espectro de ^{13}C é possível verificar que o açúcar ligado é a ramnose, visto que o C-6'' apresenta um deslocamento químico de 17,54 ppm. Enquanto os C-6'' de açúcares como a glicose e galactose apresentam deslocamento químico na faixa de 60 a 67 ppm, o da ramnose é de aproximadamente 16 a 19 ppm. Em ramnosídeos, a configuração da ligação glicosídica é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica.

Adicionalmente, foi observado no espectro de massas o íon *quasi*-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ 447, que corresponde à fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}^-$. Além disso, foram obtidos os seguintes fragmentos: m/z 301 (quercetina), 271 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}]^-$ e 255 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$.

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JPA3.

	^1H δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)] 400 MHz	^{13}C δ (ppm) D ₃ COD 100 MHz	$^{13}\text{C}^{**}$ δ (ppm) DMSO- d_6 25 MHz	$^{13}\text{C}^{***}$ δ (ppm) DMSO- d_6 125 MHz
2	-----	158,41	156,4	156,87
3	-----	136,11	134,4	133,80
4	-----	179,54	177,7	177,84
5	-----	163,11	161,2	161,65
6	6,20 [1; d; 1,9]	99,69	98,6	99,19
7	-----	165,77	164,0	164,6
8	6,38 [1; d; 1,9]	94,58	93,5	94,17
9	-----	159,20	157,0	157,05
10	-----	105,78	104,2	104,99
1'	-----	122,84*	121,0	121,67
2'	7,34 [1; d; 1,99]	116,25	115,4	115,74
3'	-----	146,32	145,1	145,20
4'	-----	149,70	148,3	148,86
5'	6,91 [1; d; 8,29]	116,81	115,8	116,77
6'	7,31 [1; dd; 1,99 e 8,29]	122,73*	121,0	122,05
1''	5,35 [s(l)]	103,43	101,9	100,86
2''	4,60 [1; s(l)]	71,92	70,4	70,50
3''	4,22 [1; dd; 1,52 e 2,95]	72,00	70,6	70,52
4''	3,75* [1; d; 3,29]	73,13	71,5	70,96
5''	3,74* [1; d; 3,29]	71,79	70,1	67,29
6''	0,94 [3; d; 6,13]	17,54	17,3	18,04

* Os sinais podem estar trocados.

** Markham *et al.*, 1978.*** Nugroho *et al.*, 2009.

Com relação à substância JPA4, analisando seu espectro de ^1H , verifica-se sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ_{H} 5,35 (d, $J = 2,05$, 1H) e 5,56 (d, $J = 2,05$, 1H) com constantes de acoplamento de hidrogênios meta correlacionados. Tais características, também presentes na substância JPA3, são observadas em flavonóides com anel A substituídos nas posições 5 e 7. Além disso, no espectro de ^1H são observados sinais em δ_{H} 6,90 (d, $J = 8,80$, 2H) e δ_{H} 6,05 (d, $J = 8,80$, 2H) com constantes de acoplamento relativas a hidrogênios orto correlacionados. Estes dados indicam monossustituição na posição 4' do anel B, conferindo-lhe simetria. O

sinal em δ_H 6,05 é atribuído aos hidrogênios 3' e 5' pois o grupo hidroxila na posição 4' configura efeito mesomérico doador de elétrons, causando proteção em orto.

Quanto ao espectro de RMN de ^{13}C da substância JPA4, sua análise e comparação com dados da literatura indicam sinais referentes ao canferol. No entanto, como observado em JPA3, JPA4 também apresentou alguns sinais remanescentes, indicando uma glicosilação. Assim, a partir do espectro de ^{13}C , verificou-se que o δ_c do C-2 é de 155,85 ppm, cerca de 9 ppm acima do observado para o canferol sem glicosilação (146,8 ppm). Como afirmado anteriormente, este efeito expressivo no deslocamento químico do C-2 sugere uma 3-O-glicosilação. Como em JPA3, o açúcar ligado trata-se de uma ramnose, visto que o δ_c de C-6'' é de 16,84 ppm. Em ramnosídeos, a configuração da ligação glicosídica é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica.

Destaca-se, ainda, que o espectro de massas de JPA4 apresentou o íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ 431, equivalente à fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{10}^-$, bem como os seguintes fragmentos: m/z 285 (canferol), 255 $[M-H-H_2O-CO]^-$ e 227 $[M-H-H_2O-2CO]^-$.

Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JPA4.

	^1H δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)] 400 MHz	^{13}C δ (ppm) DMSO- d_6 100 MHz	$^1\text{H}^*$ δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)] 500 MHz	$^{13}\text{C}^*$ δ (ppm) DMSO- d_6 125 MHz
2	-----	155,85	-----	156,94
3	-----	133,55	-----	133,71
4	-----	177,08	-----	177,89
5	-----	160,64	-----	161,63
6	5,35 [1; d; 2,05]	98,08	6,22 [1; d; 2,50]	99,21
7	-----	163,57	-----	164,60
8	5,56 [1; d; 2,05]	93,11	6,45 [1; d; 4,50]	94,38
9	-----	156,61	-----	157,30
10	-----	103,49	-----	104,42
1'	-----	119,86	-----	121,37
2'	6,90 [1; d; 8,80]	129,97	8,00 [1; d; 7,50]	131,37
3'	6,05 [1; d; 8,80]	114,75	6,89 [1; d; 7,50]	115,60
4'	-----	159,35	-----	160,37
5'	6,05 [1; d; 8,80]	114,75	6,89 [1; d; 7,50]	115,60
6'	6,90 [1; d; 8,78]	129,97	8,00 [1; d; 7,50]	131,37
1''	3,12 [1; sl]	101,14	4,40 [1; sl]	100,88
2''	2,24 [1; m]	69,67	3,47 [1; m]	70,43
3''	2,61 [1; m]	70,00	3,46 [1; m]	70,53
4''	2,24 [1; m]	70,45	3,45 [1; m]	71,00
5''	1,65 [1; m]	69,44	3,68 [1; m]	67,16
6''	0,07 [3; d; 5,72]	16,84	1,10 [3; d; 5,50]	18,01

* Nugroho *et al.*, 2009.

4.4 Estudo de eficácia pré-clínica antilitiásica do extrato hidroalcoólico de *C.*

langsдорffii em animais

4.4.1 Parâmetros gerais

Na tabela 6 estão apresentadas as médias dos parâmetros gerais de todos os grupos experimentais. Os animais apresentaram evolução normal da massa corporal com relação ao período de estudo, sem diferença significativa entre os grupos.

Quanto à ingestão de água, os grupos A e B diminuíram-na significativamente em relação ao início do protocolo. Além disso, ao final do protocolo, o grupo B diminuiu significativamente a ingestão de água em relação ao controle (grupo A).

Quanto ao volume de urina de 24 horas, todos os grupos, exceto o A, apresentaram aumento ao final do protocolo quando comparado ao volume eliminado inicialmente. Além disso, o volume final do grupo C variou significativamente em relação ao controle (grupo A).

Tabela 6: Parâmetros gerais dos animais.

Grupos	Massa corporal (g)		Ing. água (mL)		V urina 24h (mL)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
A	315,14 ±7,12	429,58* ±12,51	38,0 ±2,00	30,0* ±1,58	12,40 ±0,68	14,40 ±1,17
B	348,50 ±9,02	424,12* ±24,16	34,0 ±4,00	18,0*[∞] ±2,00	11,00 ±0,63	13,80* ±0,49
C	337,42 ±8,34	408,87* ±15,16	30,0 0	37,5 ±4,79	12,87 ±0,55	23,25*[∞] ±2,06
D	347,00 ±20,35	392,00* ±13,81	29,0 ±2,91	33,0 ±5,38	10,70 ±0,58	25,20* ±4,27

X±EP: * $p < 0,05$ vs. inicial, [∞] vs. controle (grupo A).

4.4.2 Parâmetros bioquímicos urinários

A tabela 7 apresenta os parâmetros bioquímicos urinários. As excreções de sódio e potássio não mostraram qualquer alteração importante entre os grupos analisados. Quanto à excreção de creatinina, houve um pequeno aumento ao final do protocolo nos grupos A e B, quando comparada à inicial. No entanto, apesar deste aumento, a quantidade excretada continuou na faixa de normalidade (0-250 mg/24h). Além disso, houve redução discreta, porém significativa, na excreção de

creatinina pelo grupo D ao final do protocolo, em relação à excreção final do controle (grupo A).

Tabela 7: Parâmetros bioquímicos urinários dos animais.

Grupos	Na ⁺ (mEq/24h)		K ⁺ (mEq/24h)		creatinina (mg/24h)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
A	1,73 ±0,05	1,41 ±0,16	3,89 ±0,18	2,74* ±0,21	18,55 ±1,42	27,82* ±1,55
B	1,45 ±0,20	1,25 ±0,09	3,25 ±0,27	2,48 ±1,18	19,86 ±2,80	26,05* ±2,14
C	1,79 ±1,14	1,75 ±0,08	3,05 ±0,35	2,62 ±0,56	18,10 ±1,17	23,28 ±2,86
D	1,31 ±0,06	1,91 ±0,21	2,63 ±0,26	2,18 ±0,09	22,59 ±1,50	22,54[∞] ±0,55

X±EP: * $p < 0,05$ vs. inicial, [∞] vs. controle (grupo A).

4.4.3 Parâmetros bioquímicos séricos

Na tabela 8 apresentam-se as médias dos valores obtidos nas dosagens séricas. Tanto a concentração sérica de sódio como a de potássio foram semelhantes entre os grupos estudados.

A creatinina sérica foi significativamente maior nos grupos C e D, quando comparados ao controle (grupo A), resultante de diminuição de clearance de creatinina nestes grupos. Esta diminuição foi discreta no grupo D, enquanto que no C ela foi significativa. As frações de excreção de sódio e potássio não apresentaram alterações importantes, exceto no grupo D, que apresentou pequeno aumento na fração de excreção de sódio quando comparado ao controle (Tabela 9).

Tabela 8: Parâmetros bioquímicos séricos dos animais.

Grupos	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	Creatinina (mg/dL)
A	136,0 ±1,41	5,04 ±0,12	0,70 ±0,03
B	133,2 ±0,86	4,84 ±0,24	0,76 ±0,08
C	136,0 ±1,47	5,17 ±0,19	0,85* ±0,02
D	135,4 ±1,43	4,86 ±0,19	0,89* ±0,06

X±EP: * $p < 0,05$ vs. controle (grupo A).

Tabela 9: Parâmetros de função renal dos animais.

Grupos	Cl creat (mL/min)	FE Na (%)	FE K (%)
A	2,76 ±0,12	0,26 ±0,03	13,79 ±1,25
B	2,50 ±0,34	0,27 ±0,03	14,78 ±2,05
C	1,79* ±0,27	0,43 ±0,12	18,57 ±2,68
D	2,22 ±0,45	0,56* ±0,08	18,34 ±3,12

X±EP: * $p < 0,05$ vs. controle (grupo A).

4.4.4 Análise dos cálculos

Os cálculos crescidos a partir da pastilha de CaOx são resultado da deposição de material orgânico e inorgânico sobre a pastilha original. A figura 10 mostra os cálculos retirados dos animais de cada grupo estudado. Nota-se uma

variabilidade individual substancial entre os animais de um mesmo grupo quanto à quantidade e tamanho dos cálculos formados.

Figura 10: Cálculos e satélites retirados dos animais de cada grupo estudado.

Como pode ser observado, os cálculos retirados dos animais sem qualquer tratamento (grupo C) apresentam rigidez e estão em maior número, enquanto que aqueles retirados dos animais tratados (grupo D) apresentam-se quebradiços e em quantidade menor. Estas análises podem ser confirmadas por meio da tabela 10, que apresenta a evolução dos cálculos quanto à massa e número, bem como a diferença de pressão necessária para desintegrá-los.

Tabela 10: Dados referentes aos cálculos retirados dos animais.

Grupos	m pastilha inicial (g)	m cálculos formados (g)	nº cálculos formados	pressão (kg _f)
C	0,009 ±0,001	0,286 ±0,042	25,25 ±6,96	6,90 ±3,45
D	0,010 ±0,008	0,164 ±0,066	7,40* ±3,67	3,00 ±1,51

X±EP: * P<0,05 vs. grupo operado/sem tratamento (grupo C).

As pastilhas de CaOx que foram introduzidas na bexiga dos animais apresentaram massas semelhantes. Os animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* apresentaram menor média na massa de cálculos formados, porém de forma discreta e não significativa. No entanto, a média do número de cálculos formados (matriz + satélites) apresentou uma redução bastante significativa quando os animais foram tratados com o extrato. Além disso, sugere-se que o tratamento com o extrato altere a morfologia dos cálculos, já que a pressão necessária para desintegrar os cálculos dos animais sem tratamento é, em média, cerca de duas vezes maior do que a necessária para desintegrar aqueles retirados de animais tratados ($6,90 \pm 3,45$ vs. $3,00 \pm 1,51$ kgf).

4.5 Considerações finais

A avaliação da atividade biológica de uma substância ou extrato é comumente realizada comparando-se seu desempenho ao do composto padronizado para o tratamento da patologia em questão. Tratando-se de nefrolitíase, não há disponível no mercado um fármaco padrão que atue na diminuição e eliminação dos cálculos renais; desta forma, não foi possível utilizar um controle positivo nos experimentos. Atualmente, o tratamento farmacológico restringe-se a evitar o aparecimento de recidivas, ou seja, é feito apenas de forma preventiva. Quanto às formas terapêuticas, estas envolvem procedimentos cirúrgicos ou a litotripsia de ondas de choque extracorpóreas, os quais apresentam eficácia e segurança questionáveis. Sendo assim, neste trabalho procurou-se avaliar a atividade do extrato bruto comparando-se os resultados obtidos em animais operados para os quais o extrato foi administrado durante 18 dias com àqueles obtidos em animais operados que

receberam apenas água neste período. Além disso, foi efetuada a administração de extrato bruto por 18 dias a animais não operados no sentido de verificar se algum tipo de toxicidade aguda seria observada.

A utilização de ratos como modelo experimental de litíase urinária é bastante limitada, uma vez que a deposição de oxalato de cálcio, predominante em seres humanos, praticamente não ocorre nestes animais. Outros estudos que utilizam ratos em modelo experimental de litíase empregam modificações genéticas, tais como ratos geneticamente hipercalcêmicos (BUSHINSKY *et al.*, 1999), ou manobras que alteram parâmetros envolvidos na litogênese, como a administração de etilenoglicol para reduzir o pH urinário (OGAWA; MIYAZATO; HATANO, 1999).

Neste trabalho foi utilizado o modelo de litíase por corpo estranho em ratos desenvolvido na década de 50 por Vermeulen *et al.* e padronizado no Laboratório da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP na década de 80 (COELHO, 1988). Neste modelo, a presença do cálculo não altera o metabolismo orgânico do animal, apenas causa algumas modificações locais decorrentes de sua presença nas vias urinárias (COELHO, 1988). O mecanismo de crescimento desses cálculos não é completamente conhecido, mas sabe-se que o corpo estranho introduzido cirurgicamente na bexiga do animal age como superfície de apoio permitindo a precipitação de elementos orgânicos e inorgânicos, mimetizando espontaneamente o crescimento de um cálculo (BARROS, 2006).

Empregando esse modelo de litíase por corpo estranho em ratos, Barros (2006) avaliou o papel preventivo e profilático do extrato de *Phyllanthus niruri* na litíase urinária. Neste trabalho, por meio de análises de difratometria de raios X, verificou-se que embora a pastilha introduzida na bexiga dos animais fosse de oxalato de cálcio, o material que se depositou promovendo o crescimento do cálculo

era composto de estruvita. A formação de cálculos de estruvita é comumente observada em ratos, favorecida pelo fato desta espécie possuir uma urina alcalina típica (COELHO, 1988).

Assim, se houvesse disponível um modelo em que os ratos, de fato, formassem cálculos de oxalato de cálcio, esperar-se-iam resultados ainda melhores para o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*, tendo em vista que há relatos envolvendo o uso do chá de suas folhas no tratamento da litíase em humanos e que o tipo de cálculo predominante nesta espécie é o de oxalato de cálcio.

De acordo com Wiessner e colaboradores (2001), lesões celulares no epitélio tubular renal parecem constituir um processo importante na formação de cálculos renais. O trabalho sugere que as lesões aumentam a afinidade dos cristais pelo epitélio tubular, favorecendo a adesão dos mesmos às células epiteliais. Estes cristais, ancorados, crescem à medida que novas partículas cristalinas agregam-se a eles, com consequente formação de cálculos.

Diferentes substâncias são capazes de prevenir lesões no epitélio tubular renal, inibindo, desta forma, a formação de cálculos renais (TSUJIHATA, 2008). Os componentes antioxidantes do chá verde, por exemplo, diminuiram a formação de cálculos de oxalato de cálcio em tecidos renais de ratos. O mecanismo de ação envolvido parece estar relacionado com a prevenção dessas lesões, impedindo a adesão de cristais (ITO *et al.*, 2005).

Os flavonóides quercetrina e canferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo são as primeiras substâncias descritas no extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *C. langsdorffii*. Esta classe de componentes é bastante conhecida por apresentar diferentes atividades biológicas, sendo a de agente preventivo contra o câncer e a antioxidante aquelas de maior destaque (TASDEMIR *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante dos flavonóides está diretamente relacionada às suas propriedades redutoras, como agentes doadores de hidrogênio ou elétrons. Além disso, por serem capazes de quelar metais, particularmente o ferro e o cobre, contribuem para a inibição de reações produtoras de radicais livres catalisadas por metais, reforçando seu papel antioxidante (HUDSON; LEWIS, 1983).

Determinadas características estruturais fazem com que alguns flavonóides tenham maior potencial antioxidante do que outros. Dentre elas, incluem-se a hidroxilação nas posições 5 e 7 do anel A e a hidroxilação nas posições 3' e 4' do anel B (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1997). Tendo em vista que as estruturas das substâncias isoladas contêm estas características, sendo que a quercetrina possui ambas, pode-se afirmar que estes componentes constituem poderosos antioxidantes e que a resposta obtida após o tratamento com o extrato de *C. langsdorffii* pode estar relacionada ao papel protetor destes componentes nos tecidos do sistema renal.

Adicionalmente, o estudo fitoquímico permitiu concluir que o extrato bruto de copaíba é rico em compostos polares, os quais são extraídos por extração aquosa ou hidroalcoólica e, devido as suas características polares, certamente são excretados pela via renal, garantindo-se, assim, a passagem pelo trato urinário.

Sendo assim, a constatação de que pelo menos dois flavonóides já foram identificados no extrato e de que, certamente, há vários outros, indica que os flavonóides devem desempenhar papel importante no efeito antilitiásico das folhas de copaíba, bem como indica um dos prováveis mecanismos de ação desse extrato.

5. Conclusões

- A composição química do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Copaifera langsdorffii*, constituída majoritariamente de compostos polares, é diferente da do óleo-resina, a qual é constituída principalmente por terpenos de menor polaridade;
- O estudo fitoquímico do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *C. langsdorffii* levou ao isolamento e identificação de duas substâncias, os flavonóis quercetrina (quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo) e canferol 3-O- α -L-ramnopiranosídeo;
- No ensaio antilitiásico in vivo, a média da massa total de cálculos foi discretamente menor nos animais que foram tratados com o extrato bruto liofilizado de *C. langsdorffii* em comparação ao grupo controle;
- No ensaio antilitiásico in vivo, a média do número de cálculos formados (matriz + satélites) foi significativamente menor nos animais que foram tratados com o extrato bruto liofilizado de *C. langsdorffii* em comparação ao grupo controle;
- No ensaio antilitiásico in vivo, a pressão necessária para desintegrar os cálculos dos animais do grupo controle é, em média, cerca de duas vezes maior do que a necessária para desintegrar aqueles retirados de animais

tratados com o extrato bruto liofilizado de *C. langsdorffii* ($6,90 \pm 3,45$ vs. $3,00 \pm 1,51$ kg_r).

6. Referências bibliográficas

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry**. Illinois: Allure Publishing Corporation, 2001. 451 p.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. 1 ed. The Netherlands: Elsevier, 1989. p. 336-337.
- ANAND, R.; PATNAIK, G. K.; KULSHRESHTHA, D. K. Antiurolithiatic activity of lupeol, the active constituent isolated from *Crataeva nurvala*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 417-421, 1994.
- BALAJI, K. C.; MENON, M. Mechanism of stone formation. **Urologic Clinics of North America**, v. 24 (1), p. 1-11, 1997.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARROS, M. E. Efeito terapêutico *versus* efeito preventivo do *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) sobre a formação e composição de cálculos em modelo experimental de litíase urinária. Tese de Doutorado: Universidade Federal de São Paulo, 2006.
- BARROS, M. E.; LIMA, R.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. **Urological Research**, v. 34, p. 351-357, 2006.
- BENSATAL, A.; OUAHRANI, M. R. Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of *Tamarix gallica* L. **Urological Research**, v. 36, p. 283-287, 2008.
- BORGHI, L.; SCHIANCHI, T.; MESCHI, T. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 77-84, 2002.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3 ed. Fortaleza, 1960, p. 401.
- BRUNETON, J. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**. Paris: Lavoisier, 1987. p. 585.
- BUSHINSKY, D. A.; NEUMANN, K. J.; ASPLIN, J.; KRIEGER, N. S. Alendronate decreases urine calcium and supersaturation in genetic hypercalciuric rats. **Kidney International**, v. 55(1), p. 234-243, 1999.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CLEMENT, R. E. **Gas chromatography: biochemical, biomedical and clinical applications**. Nova York: John Wiley and Sons, 1990. 393 p.
- COELHO, S. T. N. Litíase experimental: sistematização do modelo com corpo estranho em ratos. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de São Paulo, 1988.
- COSTA-BAUZÁ, A.; ISERN, B.; PERELLÓ, J.; SANCHIS, P.; GRASES, F. Factors affecting the regrowth of renal stones in vitro: a contribution to the understanding of renal stone development. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 39, p. 194-199, 2005.
- CURHAN, C. G.; WILLET, W. C.; RIMM, R. B.; STAMPFER, M. J. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 833-838, 1993.
- CURHAN, C. G.; WILLET, W. C.; SPEIZER, F. E.; STAMPFER, M. J. Beverage use and risk of kidney stones in women. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, p. 534-540, 1998.
- CURHAN, C. G.; WILLETT, W. C.; KNIGHT, E. L.; STAMPFER, M. J. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 885-891, 2004.
- DANPURE, C. J. Molecular etiology of primary hyperoxaluria type I. **American Journal of Nephrology**, v. 25, p. 303-310, 2005.
- ETTINGER, B.; TANG, A.; CITRON, J. T.; LIVERMORE, B.; WILLIAMS, T. Randomized trial of allopurinol in the prevention of calcium oxalate calculi. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 1386-1389, 1986.
- GETTMAN, M. T.; SEGURA, J. W. Struvite stones: diagnosis and current treatment concepts. **Journal of Endourology**, v. 13, p. 653-658, 1999.
- GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 486-492, 2007.
- GRASES, F.; COSTA-BAUZÁ, A.; PRIETO, R. M. Renal lithiasis and nutrition. **Nutrition Journal**, v. 5, p. 23-30, 2006.
- GROVER, P. K.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; RYALL, R. L. Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro – a comparison of four human proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 253 (3), p. 637-644, 1998.

- HARBAR, J. A.; CUSWORTH, D. C.; LAWES, L. C.; WRONG, O. M. Comparison of 2-mercaptopropionylglycine and D-penicillamine in the treatment of cystinuria. **Journal of Urology**, v. 136, p. 146-149, 1986.
- HARVEY, J. A.; HILL, K. D.; PAK, C. Y. Similarity of urinary risk factors among stone-forming patients in five regions of the United States. **Journal of Lithotripsy & Stone Disease**, v. 2, p. 124-132, 1990.
- HUDSON, B. J. F.; LEWIS, L. I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. **Food Chemistry**, v. 10, p. 47-55, 1983.
- INDEX Kewensis. 20 ed. Oxford: Clarendon Press, 1996.
- ITO, Y.; YASUI, T.; OKADA, A.; TOZAWA, K.; HAYASHI, Y.; KOHRI, K. Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. **Journal of Urology**, v. 173, p. 271-275, 2005.
- KARADI, R. V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R.; SAVADI, R. V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 306-311, 2006.
- KOEHN, F. F.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.
- LAROUBI, A.; TOUHAMI, M.; FAROUK, L.; ZRARA, I.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREL, A.; CHAIT, A. Prophylaxis effect of *Trigonella foenum graecum* L seeds on renal stone formation in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 921-925, 2007.
- LAWRENCE, B. M. Progress in essential oil. **Natural Flavor and Fragrance Materials**, v. 5, 32 p., 1980.
- LHUIILLIER, A.; FABRE, N.; MOYANO, F.; MARTINS, N.; CLAPAROLS, C.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Comparison of flavonoids profile of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, p. 13-20, 2007.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MANDEL, N. Mechanism of stone formation. **Seminars in Nephrology**, v. 16 (5), p. 364-374, 1996.
- MARKHAM, K. R.; TERNAJ, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids – III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1389-1397, 1978.

- MATTOS FILHO, A.; RIZZINI, C. T.; MAUTONE, L.; GUIMARÃES, E. F. **Árvores do Jardim Botânico**. Rio de Janeiro: Lidador, 1993, p. 67.
- MC CHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MERCHANT, M. L.; CUMMINS, T. D.; WILKEY, D. W.; SALYER, S. A.; POWELL, D. W.; KLEIN, J. B.; LEDERER, E. D. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory process in calcium stone formation. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 295, p. F1254-F1258, 2008.
- MOE, O. W. Kidney stones: pathophysiology and medical management. **Lancet**, v. 367, p. 333-344, 2006.
- MORS, W.; RIZZINI, C. T. **Useful Plants of Brazil**. São Francisco: Holden-Day Inc, 1966. p. 45.
- NANCOLLAS, G. H.; SMESKO, S. A.; CAMPBELL, A. A.; RICHARDSON, C. F.; JOHNSON, M.; IADICCICO, R. A.; BINETTE, J. P.; BINETTE, M. Physical chemical studies of calcium oxalate crystallization. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 17 (4), p. 392-395, 1991.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- NISHIURA, J. L.; CAMPOS, A. H.; BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. **Urological Research**, v. 32 (5), p. 362-366, 2004.
- NUGROHO, A.; CHOI, J.; PARK, J.; LEE, K.; CHA, B.; PARK, H. Two new flavonols glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their in vitro free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. **Planta Med**, v. 75, p. 364-366, 2009.
- OGAWA, Y.; MIYAZATO, T.; HATANO, T. Importance of oxalate precursors for oxalate metabolism in rats. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 10, p. 341-344, 1999.
- PAIVA, L. A. F.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from

- Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737-739, 2002b.
- PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; DE SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic-acid induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 51-56, 2004.
- PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303-307, 2002a.
- PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect in ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73-78, 1998.
- PEREZ, R. M.; VARGAS, R.; PEREZ, S.; ZAVALA, M. A.; PERZ, C. Antiuro lithiatic activity of 7-hydroxy-2',4',5'-thimethoxyisoflavone and 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone from *Eysenhardtia polystachya*. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 7, p. 27-34, 2000.
- PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 51-55, 1999.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. São Paulo: Ministério da Agricultura, 1931. p. 370.
- PRASAD, K. V. S. R. G.; SUJATHA, D.; BHARATHI, K. Herbal drugs in urolithiasis – a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 175-179, 2007.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RICE-EVANS, A. C.; NICHOLAS, J. M.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**. 6 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. p. 65.
- SANNIDI, D. N.; KUMAR, A.; KUMAR, N. To evaluate the effect of Ayurvedic drugs Sveta parpati with pashanabheda and Gokshura in the management of Mutrasmari. Proceedings of National Science Council, Part B. **Life Sciences**, v. 21, p. 13-19, 1997.
- SCHNEIDER, H. J.; UNGER, G.; ROSIER, D.; BOTHOR, C.; BERG, W.; ERNST, G. Effect of drugs used for the prevention of urinary calculi recurrence on the growth and metabolism of young experimental animals. **Zeitschrift für Urologie und Nephrologie**, v. 72, p. 237-247, 1979.

- SIENER, R. Impact of dietary habits on stone incidence. **Urological Research**, v. 34, p. 131-133, 2006.
- SINGH, C. M.; SACHAN, S. S. Management of urolithiasis by herbal drugs. **Journal of Nepal Pharmaceutical Association**, v. 7, p. 81-85, 1989.
- SOMOVA, L. I.; SHODE, F. O.; MOODLEY, K.; GOENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 165-174, 2001.
- TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50(4), p. 1352-1364, 2006.
- TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DA COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; DE OLIVEIRA, P. C.; OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233-241, 2004.
- TSUJIHATA, M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. **International Journal of Urology**, v. 15, p. 115-120, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VIEL, T. A.; MONTEIRO, A. P. S.; LANDMAN, M. T. R. L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Evaluation of antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 193-198, 1994.
- VON UNRUH, G. E.; VOSS, S.; SAUERBRUCH, T.; HESSE, A. Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 15, p. 1567-1573, 2004.
- WIESSNER, J. H.; HASEGAWA, A. T.; HUNG, L. Y.; MANDEL, G. S.; MANDEL, N. S. Mechanisms of calcium oxalate attachment to injured renal collecting duct cells. **Kidney International**, v. 59, p. 637-644, 2001.
- WILL, E. J.; BELL, G. D.; TAYLOR, M.; RICHMOND, C.; MIDDLETON, A.; JOHNSON, N.; DHILLON, B. Natural volatile oils in the management of renal calculi stone disease. In: SMITH, L. H.; ROBERTSON, W. G.; FINLAYSON. **Urolithiasis, Clinical and Basic Research**. New York: Plenum Press, 1981. p. 293-296.
- WORCESTER, E. M. Inhibitors of stone formation. **Seminars in Nephrology**, v. 16, p. 474-486, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional and Alternative Medicine**. Geneva: World Health Organization, 2002. 271 p.

ZHAO, H.; SUN, J.; FAN, M.; FAN, L.; ZHOU, L.; LI, Z.; HAN, J.; WANG, B.; GUO, D.
Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry.
Journal of Chromatography A, v. 1190, p. 157-181, 2008.

Anexos

Anexo 1. Parâmetros gerais

Tabela 11: Parâmetros gerais dos animais do grupo A.

Animal	Massa corporal (g)		Ing. água (mL)		V urina 24 h (mL)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	332	455,6	40	30	12,5	16
2	290,8	386,1	40	30	10,5	12
3	325,7	440,7	40	25	14,5	12
4	316,8	418,3	40	35	13	18
5	310,4	447,2	30	30	11,5	14
M	315,14	429,58	38	30	12,4	14,4
DP	15,917	27,968	4,472	3,536	1,517	2,608
EP	7,118	12,508	2	1,581	0,678	1,166

Tabela 12: Parâmetros gerais dos animais do grupo B.

Animal	Massa corporal (g)		Ing. água (mL)		V urina 24 h (mL)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	333,2	380,8	30	20	8,5	12
2	357,2	433,2	40	20	11,5	14
3	380	514,3	40	10	12	14
4	338,9	399,2	20	20	11,5	14
5	333,2	393,1	40	20	11,5	15
M	348,5	424,12	34	18	11	13,8
DP	20,176	54,025	8,944	4,472	1,414	1,095
EP	9,023	24,161	4	2	0,632	0,49

Tabela 13: Parâmetros gerais dos animais do grupo C.

Animal	Massa corporal (g)		Ing. água (mL)		V urina 24 h (mL)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	359,3	439,6	30	30	13,5	24
2	340,7	374,5	30	50	11,5	28
3	321	428,4	30	30	14	23
4	328,7	393	30	40	12,5	18
M	337,43	408,875	30	37,5	12,875	23,25
DP	16,685	30,325	0	9,574	1,109	4,113
EP	8,342	15,163	0	4,787	0,554	2,056

Tabela 14: Parâmetros gerais dos animais do grupo D.

Animal	Massa corporal (g)		Ing. água (mL)		V urina 24 h (mL)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	382,3	402,3	40	25	10,5	14
2	392,4	421,2	30	30	9	18
3	302,4	359,7	25	20	10	38
4	363,1	418,3	25	50	12	30
5	294,8	358,5	25	40	12	26
M	347	392	29	33	10,7	25,2
DP	45,499	30,887	6,519	12,042	1,304	9,55
EP	20,348	13,813	2,915	5,385	0,583	4,271

Anexo 2. Parâmetros bioquímicos urinários

Tabela 15: Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo A.

Animal	Na (mEq/24 h)		K (mEq/24 h)		creatinina (mg/24 h)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	1,75	1,984	4,375	3,28	23,66	30,7
2	1,785	1,26	3,544	2,4	15	24,54
3	1,537	1,128	4,1325	2,16	17,41	23,62
4	1,729	1,134	3,965	3,15	17,93	29,38
5	1,863	1,568	3,421	2,73	18,75	30,84
D	1,733	1,415	3,888	2,744	18,55	27,816
MP	0,121	0,365	0,4	0,477	3,18	3,473
EP	0,054	0,163	0,179	0,214	1,422	1,553

Tabela 16: Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo B.

Animal	Na (mEq/24 h)		K (mEq/24 h)		creatinina (mg/24 h)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	1,36	1,328	2,38	2,72	19,524	20,22
2	1,61	1,188	3,708	2,16	21,035	28,57
3	2,112	0,924	3,93	2,16	29,38	32,76
4	1,196	1,476	3,0475	3,06	17	24,09
5	0,9545	1,316	3,1625	2,31	12,36	24,6
D	1,447	1,246	3,246	2,482	19,86	26,048
MP	0,442	0,207	0,608	0,396	6,256	4,778
EP	0,198	0,0926	0,272	0,177	2,798	2,137

Tabela 17: Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo C.

Animal	Na (mEq/24 h)		K (mEq/24 h)		creatinina (mg/24 h)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	2,187	1,968	3,645	4,272	14,72	26,34
2	1,5985	1,736	3,65	2,324	19,54	26,15
3	1,736	1,702	2,52	2,001	19,78	25,95
4	1,625	1,584	2,375	1,89	18,37	14,7
D	1,787	1,748	3,047	2,622	18,102	23,285
MP	0,273	0,161	0,695	1,115	2,338	5,726
EP	0,137	0,0804	0,348	0,558	1,169	2,863

Tabela 18: Parâmetros bioquímicos urinários dos animais do grupo D.

Animal	Na (mEq/24 h)		K (mEq/24 h)		creatinina (mg/24 h)	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	1,47	1,582	3,6	1,974	26,35	21,33
2	1,215	1,296	2,745	2,124	25,6	21,61
3	1,14	2,242	2,2	2,47	22,19	22,05
4	1,44	1,95	2,34	2,31	18,47	23,69
5	1,29	2,47	2,27	2	20,33	24
D	1,311	1,908	2,631	2,176	22,588	22,536
MP	0,142	0,477	0,582	0,211	3,37	1,227
EP	0,0636	0,213	0,26	0,0946	1,507	0,549

Anexo 3. Parâmetros bioquímicos séricos

Tabela 19: Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo A.

Animal	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	creatinina (mg/dL)
1	139	5	0,83
2	135	4,8	0,65
3	131	5,2	0,65
4	137	4,8	0,69
5	138	5,4	0,68
D	136	5,04	0,7
MP	3,162	0,261	0,0748
EP	1,414	0,117	0,0335

Tabela 20: Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo B.

Animal	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	creatinina (mg/dL)
1	132	4,3	0,71
2	133	4,5	0,63
3	131	4,8	0,68
4	136	4,9	1,09
5	134	5,7	0,68
D	133,2	4,84	0,758
MP	1,924	0,537	0,188
EP	0,86	0,24	0,084

Tabela 21: Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo C.

Animal	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	creatinina (mg/dL)
1	137	5,4	0,83
2	132	4,8	0,87
3	139	4,9	0,8
4	136	5,6	0,9
D	136	5,175	0,85
MP	2,944	0,386	0,044
EP	1,472	0,193	0,022

Tabela 22: Parâmetros bioquímicos séricos dos animais do grupo D.

Animal	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	creatinina (mg/dL)
1	135	5	0,8
2	140	5,1	0,79
3	135	4,1	1,12
4	131	5,1	0,9
5	136	5	0,83
D	135,4	4,86	0,888
MP	3,209	0,428	0,137
EP	1,435	0,191	0,0611

Anexo 4. Parâmetros de função renal

Tabela 23: Parâmetros de função renal dos animais do grupo A.

Animal	Clearance creatinina (mL/min)	Fração excreção Na (%)	Fração excreção K (%)
1	2,569	0,386	17,733
2	2,622	0,247	13,244
3	2,523	0,237	11,433
4	2,956	0,194	15,414
5	3,15	0,25	11,146
M	2,764	0,263	13,794
DP	0,275	0,0722	2,785
EP	0,123	0,0323	1,246

Tabela 24: Parâmetros de função renal dos animais do grupo B.

Animal	Clearance creatinina (mL/min)	Fração excreção Na (%)	Fração excreção K (%)
1	1,978	0,265	16,659
2	3,15	0,23	12,347
3	3,345	0,171	10,897
4	1,535	0,382	21,973
5	2,512	0,291	12,002
M	2,504	0,268	14,776
DP	0,765	0,0781	4,582
EP	0,342	0,0349	2,049

Tabela 25: Parâmetros de função renal dos animais do grupo C.

Animal	Clearance creatinina (mL/min)	Fração excreção Na (%)	Fração excreção K (%)
1	2,205	0,452	24,917
2	1,58	0,437	16,107
3	2,252	0,117	12,592
4	1,133	0,714	20,68
M	1,793	0,43	18,574
DP	0,536	0,244	5,371
EP	0,268	0,122	2,685

Tabela 26: Parâmetros de função renal dos animais do grupo D.

Animal	Clearance creatinina (mL/min)	Fração excreção Na (%)	Fração excreção K (%)
1	1,852	0,439	14,803
2	1,899	0,338	15,232
3	1,366	0,844	30,614
4	3,957	0,566	17,222
5	2,008	0,628	13,848
M	2,216	0,563	18,344
DP	1,004	0,193	6,969
EP	0,449	0,0863	3,116

Anexo 5. Análises dos cálculos

Tabela 27: Análise dos cálculos retirados dos animais do grupo C.

animal	m. pastilha inicial (g)	m. cálculos formados (g)	cálculos formados	pressão (kgF)
1	0,0081	0,305	45	17
2	0,0065	0,386	25	3
3	0,0098	0,181	16	5,6
4	0,0117	0,271	15	2
M	0,00903	0,286	25,25	6,9
DP	0,00224	0,0849	13,913	6,902
EP	0,00112	0,0424	6,957	3,451

Tabela 28: Análise dos cálculos retirados dos animais do grupo D.

animal	m. pastilha inicial (g)	m. cálculos formados (g)	cálculos formados	pressão (kgF)
1	0,0115	0,037	1	8
2	0,0129	0,156	8	0
3	0,0119	0,003	1	0
4	0,0079	0,295	6	2,5
5	0,0104	0,328	21	4,5
M	0,0109	0,164	7,4	3
DP	0,00191	0,147	8,204	3,373
EP	0,000855	0,0656	3,669	1,508

Anexo 6. Espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da substância JPA3 **Figura 11:** Espectro de RMN ^{13}C da substância JPA3 (100 MHz, D_3COD).

Figura 12: Espectro de RMN ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).

Figura 13: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).

Figura 14: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).

Figura 15: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA3 (400 MHz, D_3COD).

Anexo 7. Espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da substância JPA4

Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C da substância JPA4 (100 MHz, DMSO- d_6).

Figura 17: Espectro de RMN ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO-d_6).

Figura 18: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO-d_6).

Figura 19: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO-d_6).

Figura 20: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO-d_6).

Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância JPA4 (400 MHz, DMSO-d_6).