UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenico

Eduardo Felipe Alves Fernandes

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenoico

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Eduardo Felipe Alves Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 11 de março de 2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2013

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.

Fernandes, Eduardo Felipe Alves

Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenoico. Ribeirão Preto, 2013.

61p.;30cm.

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

Orientador: Lopes, N. P.

1. Produtos Naturais
2. Metabolismo in vitro
3. Ácido caurenoico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Felipe Alves Fernandes

Metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenoico

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a).Dr(a).:_____

Instituição:_____

Assinatura:

Prof(a).Dr(a).:_____

Instituição:_____

Assinatura:

Prof(a).Dr(a).:_____

Instituição:_____

Assinatura:

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, e à minha família

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela orientação, amizade e respeito.

À empresa Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produto Naturais e em especial ao Prof.Dr. José Norberto Callegari Lopes pela liberação para a condução deste trabalho e aos amigos pelo apoio e compreensão

A técnica de laboratório Izabel Cristina Casanova Turatti pelo apoio na aquisição dos dados de GC-EM e pelas discussões científicas.

Aos técnicos de Laboratório José Carlos Tomaz e Jacqueline Nakau Mendonça pela aquisição dos dados de espectrometria de massas

Aos demais técnicos e docentes do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, pelo apoio

Ao Laboratório de Bioinorgânica da FFCLRP e em especial ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, a Prof. Dra. Marilda das Dores Assis e a Dra. Valéria Priscila de Barros pela colaboração

Aos amigos Dra. Denise Brentan Silva, Daniel Petinatti Pavarini, Leandro De Santis Ferreira e Dayana Rubio Gouvea, pelas críticas e por fazerem os momentos de crise mais alegres.

Aos alunos Arthur de Barros Bello Ribeiro e Maria Júlia Gabriel pelo suporte e amizade.

A Madeleine Ernst pelo auxílio com os scripts do R e com o L^AT_EX

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelos fomentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP pelo apoio institucional

RESUMO

FERNANDES, E.F.A. **Metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenico**. 2013. 61f. Dissertação(Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto,2013.

Apesar do amplo e histórico uso de produtos da biodiversidade brasileira com fins medicinais, pouco se sabe sobre o destino destes produtos após a sua absorção no organismo; quais são os produtos de metabolismo formados, sua toxicidade e cinética de eliminação. Neste trabalho foi estudado o metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenico. Este terpeno está amplamente distribuído no reino vegetal tendo sua ocorrência destacada em dois dos maiores produtos fitoterápicos consumidos pela população brasileira: o óleo de copaíba (*Copaifera ssp.*) e o xarope de guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania leavigata*). Entre as principais reações do metabolismo em humanos, as reações de oxidação mediadas pelo citocromo P450(CYP450) têm um papel chave na detoxificação de xenobióticos. O objetivo deste trabalho foi estudar modelos biomiméticos *in vitro* das reações realizadas pelo CYP450 utilizando metaloporfirinas e reagentes de salen como catalisadores. Foram empregados sete catalisadores em meio homogêneo: Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro e manganês III (FeTFPP) e (MnTFPP), Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina ferro e manganês III (FeTDCPP) (MnTDCPP), Cloreto de (*R,R*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*tert*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III (*R*-Salen), Cloreto de (*S,S*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*tert*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III (*S*-Salen) e o Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina ferro III (FeTPP). Como doadores de oxigênio foram avaliados o iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), *tert*-butil-hidroperóxido (TBHP) e (ácido 3-cloro-peroxibenzoico (MCPBA). Nos sistemas estudados foi observada a formação predominante de três produtos de oxidação: Um derivado epoxidado, um mono- e um di-hidroxilado, que tiveram sua estrutura proposta com base na análise do seu perfil de fragmentação em espectrometria de massas e comparação com dados previamente publicados na literatura. Foi observado que a natureza do oxidante influencia de forma mais pronunciada tanto a reatividade como a formação dos produtos. Foram avaliados também os catalisadores FeTFPP e o cloreto de 5,10,15,20-tetraquis-(4-N-metilpiridil)porfirina ferro III(FeTMPyP) imobilizados em suportes inorgânicos. A utilização destes catalisadores imobilizados resultou na maior reatividade do ácido caurenico com a formação dos mesmos três produtos, mas em maior proporção em relação ao substrato. Por fim, foi realizada a catalise em meio biológico utilizando microsomas de ratos. Neste sistema foi gerado somente um produto que apresentou espectro de massas e tempo de retenção similar ao derivado di-hidroxilado obtido nas reações que utilizaram metaloporfirinas. Este trabalho trouxe evidências da rota de metabolismo de um importante produto natural, além de reforçar a capacidade de metaloporfirinas em realizar catálises biomiméticas, que serão úteis para a geração de metabólitos de fase um para estudos pré-clínicos.

ABSTRACT

FERNANDES, E.F.A. ***In vitro* metabolism of the diterpene kaurenoic acid.** 2013. 61f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

In spite of the widespread and historical use of products of the Brazilian biodiversity for medical purposes, little is known about the fate of these products after their absorption into the organism; which are the products of metabolism, their toxicity and elimination kinetics. In this master thesis the *in vitro* metabolism of the diterpene kaurenoic acid was studied. This terpene is widely spread in the plant kingdom. Its presence can especially be highlighted in two of the most consumed phytotherapeutics by the Brazilian population: the copaíba oil (*Copaifera ssp.*) and the guaco syrup (*Mikania glomerata* and *Mikania leavigata*). Among the principal metabolic reactions in humans, the oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 (CYP450) have a key role in the detoxification of xenobiotics. The objective of this thesis was the study of *in vitro* biomimetic models of the reactions carried out by CYP450 using metalloporphyrins and salen catalysts as analogs of the CYP450. Seven catalysts were applied in a homogeneous medium: 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin iron and manganese III chloride (FeTFPP) and (MnTFPP), 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorophenyl)porphyrin iron and manganese III chloride (FeTDCPP) and (MnTDCPP), (*R,R*)-(-)-N,N-bis(3,5-di-tert-butylsalicylidene)-1,2-diaminocyclohexyl manganese III (*R*-Salen) chloride, (*S,S*)-(-)-N,N-bis(3,5-di-tert-butylsalicylidene)-1,2-diaminocyclohexyl manganese III (*S*-Salen) chloride and 5,10,15,20-tetrakis(phenyl)porphyrin iron III chloride (FeTPP). As oxygen donors iodossylbenzene (PhIO), hydrogen peroxide (H₂O₂), tert-butyl hydroperoxide (TBHP) and metachlorperoxybenzoic acid (MCPBA) have been tested. In the majority of the systems the formation of three predominant oxidation products was observed: An epoxidated, a mono- and a dihydroxylated derivative, of which the chemical structure was proposed based on the analysis of the mass spectrometric fragmentation pattern. It was observed that the nature of the oxidant influences more markedly the reactivity as well as the formation of the products. The catalysts FeTFPP and 5,10,15,20-tetrakis-(4-N-methylpyridine)porphyrin iron III chloride (FeTMPyP) immobilized with inorganic supports were assessed as well. Using these immobilized catalysts, a higher proportion of oxidation products of the kaurenoic acid was observed. Finally, the oxidation of kaurenoic acid was assessed using rat microsomes. In this system only one product was produced that showed a similar mass spectrum and retention time as the dihydroxylated derivative obtained in the reactions using metalloporphyrins. This thesis showed evidences of the route of metabolism of an important natural product, and additionally reinforces the capacity of metalloporphyrins in attaining biomimetic catalysis.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Ciclo catalítico do citocromo P450. Adaptado de Lohmann e Karst (2008)	p. 4
1.2	Exemplos de metaloporfirinas e catalisadores de salen utilizados como modelos biomiméticos	p. 6
1.3	Estrutura química do ácido caurenoico	p. 7
4.1	Cromatograma dos produtos isolados a partir de resinas de <i>Copaifera ssp.</i>	p. 20
4.2	Espectro resultante da subtração do espectro de ^1H da mistura ácido cauranoico:ácido caurenoico com o espectro de ^1H do ácido caurenoico puro	p. 21
4.3	Espectro de massas dos produtos isolados a partir de resinas de <i>Copaifera ssp.</i>	p. 21
4.4	Cromatogramas obtidos por CG-EM das frações purificadas por CLV do material de partida (extrato hexânico WPH1) e espectro de massas do sinal com tempo de retenção de 16,7 min correspondente ao ácido caurenoico derivatizado	p. 22
4.5	Cromatograma e espectro de massas do ácido caurenoico obtido após purificação em coluna	p. 23
4.6	Cromatograma representativo da análise por CG-EM de uma reação sem derivatização	p. 26
4.7	Cromatograma representativo da análise do ácido caurenoico sem derivatização (A) e com derivatização (B)	p. 27
4.8	Cromatograma representativo da análise por CG-EM de uma reação de oxidação	p. 28
4.9	Proposta de fragmentação do ácido caurenoico	p. 29
4.10	Proposta de fragmentação do composto 5	p. 31

4.11	Propostas de estruturas químicas e espectros de massas dos produtos observados após análise por CG-EM	p. 32
4.12	Influência do tipo de oxidante e catalisador na integridade do substrato após reação. Condições reacionais descritas na seção 3.4.1	p. 34
4.13	Geração de diferentes intermediários reacionais em função do tipo da clivagem do peroxo.	p. 35
4.14	Formação dos produtos de oxidação: influência do tipo de oxidante e catalisador	p. 37
4.15	Integridade do substrato submetido a diferentes condições reacionais. Descrição na seção 3.4.1	p. 38
4.16	Cromatograma representativo de reação de oxidação do ácido caurenóico utilizando catalisador FeTFPP suportado em 1,6-Diaminohexil sílica. A- meio analisado sem extração. B- meio extraído com MeOH e analisado.	p. 40
4.17	Formação dos produtos de oxidação do ácido caurenóico após catálise heterogênea	p. 41
4.18	Formação dos produtos de oxidação do ácido caurenóico utilizando microsossomas hepáticos	p. 42
4.19	Comparação dos espectros de massas dos produtos obtidos através de reações utilizando microsossomas hepáticos e catalisadores metaloporfíricos	p. 43
4.20	Análise por UPLC-MS do produto reacional obtido utilizando microsossomas hepáticos de ratos	p. 44
4.21	Espectro de massas do produto reacional obtido utilizando microsossomas hepáticos de ratos com ionização por eletrospray	p. 45
4.22	Espectros de MS/MS gerados através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z= 335$. Energias de colisão variando de 20 a 40V	p. 46

LISTA DE TABELAS

1.1	Teores de ácido caurenoico encontrados em diferentes espécies de plantas	p. 7
3.1	Fracionamento em CLV da fração WPH1	p. 13
3.2	Parâmetros experimentais utilizados no método de análise 1 por CG-EM	p. 14
3.3	Parâmetros experimentais utilizados no método de análise 2 (sem derivatização) por CG-EM	p. 15
3.4	Parâmetros do detector TQ	p. 16
4.1	Dados de ^1H -RMN do produto isolado e valores da literatura	p. 23
4.2	Dados de ^{13}C -RMN do produto isolado e valores da literatura	p. 24
4.3	Formação dos produtos de oxidação: influência do tipo de oxidante e catalisador	p. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FeTFPP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III

FeTPP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina ferro III (FeTPP)

MNTFPP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina manganês III

FeTDCPP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina ferro III

MnTDCPP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina ferro III

S,S-Salen- Cloreto de (*S,S*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*terc*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III

R,R-Salen- Cloreto de (*R,R*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*terc*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III

FeTMPyP- Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis-(4-N-metilpiridil)porfirina ferro III

ACN- Acetonitrila

AcOEt- Acetato de Etila

APS- Aminopropilsilica

BSTFA- N-O-bis(trimetilsilil)tetrafluoroacetamida

CIP450- Citocromo P450

CID- Dissociação induzida por colisão

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE- Cromatografia líquida de ultra eficiência

CCDC- Cromatografia em camada delgada comparativa

CHCl₃- Clorofórmio

CLV- Coluna líquida a vácuo

DCM- Diclorometano

DaHS- Diaminohexilsílica

EM- Espectrometria de massas

ESI- Ionização por eletrospray

EtOH- Etanol

FCRPR- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FFCLRP- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

h- Horas

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

J- Constante de acoplamento e Hetz

MeOH- Metanol

MCPBA- Ácido 3-cloro-peroxibenzoico

m/z- Relação massa-carga

mont- argila montmorilonita

NaOCl- Hipoclorito de Sódio

PhIO- Iodosilbenzeno

ppm- partes por milhão

RMN- Ressonância magnética nuclear

TBHP- terc-butil-hidroperóxido

TQ- Triplo quadrupolo

UV- Ultravioleta

WPH1- Fração hexânica de partes aéreas de *Wedelia paludosa*

SUMÁRIO

Resumo	p. i
Abstract	p. ii
Lista de Figuras	p. iii
Lista de Tabelas	p. iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	p. v
1 Introdução	p. 1
1.1 Aspectos gerais do metabolismo de xenobióticos	p. 1
1.2 As enzimas citocromo P450 e suas reações no metabolismo	p. 2
1.3 Sistemas oxidativos <i>in vitro</i>	p. 4
1.4 Modelo em estudo: ácido caurenóico	p. 6
2 Objetivos	p. 9
2.1 Objetivos gerais	p. 9
2.2 Objetivos específicos	p. 9
3 Materiais e métodos	p. 10
3.1 Reagentes e equipamentos utilizados	p. 10
3.2 Isolamento do ácido caurenóico	p. 11
3.2.1 Isolamento a partir de <i>Copaifera ssp</i>	p. 11
3.2.2 Isolamento a partir de <i>Wedelia paludosa</i>	p. 12

3.3	Metodologias analíticas	p. 13
3.3.1	Cromatografia em camada delgada comparativa.	p. 13
3.3.2	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas	p. 14
3.3.3	Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas <i>tandem</i> e a arranjo de diodos (CLUE-EM/EM) .	p. 14
3.3.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e de carbonos (^{13}C -RMN)	p. 15
3.4	Reações oxidativas	p. 16
3.4.1	Catálise homogênea	p. 16
3.4.2	Catálise heterogênea	p. 18
3.4.3	Catálise utilizando microsomas hepáticos	p. 18
4	Resultados e Discussão	p. 19
4.1	Isolamento do ácido caurenóico a partir de <i>Copaifera ssp</i>	p. 19
4.2	Isolamento do ácido caurenóico a partir de <i>Wedelia paludosa</i>	p. 22
4.3	Metodologias analíticas	p. 24
4.4	Caracterização dos produtos de oxidação do ácido caurenóico	p. 27
4.5	Catálise homogênea	p. 32
4.5.1	Análise da reatividade do ácido caurenóico em diferentes sistemas oxidativos: influência do tipo de catalisador e oxidante	p. 32
4.5.2	Análise da reatividade do ácido caurenóico: Influência do solvente e da concentração do catalisador	p. 38
4.6	Catálise heterogênea	p. 39
4.7	Catálise utilizando microsomas hepáticos	p. 41
5	Conclusões	p. 47
	Apêndice A – Algoritmo utilizado para a importação dos dados	p. 49

Anexo A – Espectros de ^1H -RMN dos produtos isolados à partir de <i>Copaifera ssp</i>	p. 51
Anexo B – Espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 dos produtos isolados à partir de <i>Copaifera ssp</i>	p. 52
Anexo C – Espectros de ^1H -RMN do produto isolados à partir de <i>Wedelia paludosa</i>	p. 54
Anexo D – Espectros de ^{13}C -RMN e DEPT-135 do produto isolados à partir de <i>Wedelia paludosa</i>	p. 55
Referências Bibliográficas	p. 57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do metabolismo de xenobióticos

Fármacos, toxinas, contaminantes ambientais e outras substâncias exógenas ao organismo, ao serem absorvidos, passam por uma série de biotransformações que resultam em produtos de metabolismo de maior polaridade que são mais facilmente eliminados pela urina e por outros fluidos corpóreos. Este mecanismo de destoxificação tem um importante papel na farmacocinética e na ativação de medicamentos. Durante o desenvolvimento de um novo fármaco, os estudos de metabolismo podem determinar sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, estabelecer a identidade química dos principais metabólitos e sua toxicidade, além de fornecer protótipos com maior atividade (bioativação) do que o fármaco original (PEARSON; WIENKERS, 2008). Os tipos de reações metabólicas podem ser divididos em: reações de fase I, que são responsáveis por oxidações, reduções e hidrólises e reações de fase II que conjugam grupos polares diretamente no fármaco, ou em um produto de uma reação de fase I. Os produtos gerados por reações de fase II tendem a ser associados diretamente a produtos de destoxificação e a um aumento pronunciado da solubilidade da substância em água (COLEMAN, 2010).

Um dos primeiros exemplos de fármacos que se valeram da bioativação metabólica é o antibiótico Prantosil, que após uma azoredução gera a substância ativa sulfanilamida. Entretanto, nem sempre o metabólito gerado tem ação terapêutica. O exemplo da talidomida é um caso notável, trata-se de um sedativo amplamente prescrito para o desconforto matinal em gestantes e que *in vivo*, leva a formação de um estereoisômero teratogênico. Estima-se que mais de 10.000 crianças tenham sofrido deformações congênitas devido à administração deste fármaco (FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004).

O debate sobre o papel dos estudos de metabolismo no desenvolvimento de um novo medicamento e principalmente sobre a avaliação da toxicidade destes metabólitos formados é recente. Em 2002 foi publicada uma nota assinada por sete empresas farmacêuticas

multinacionais expressando suas opiniões e condutas a respeito da avaliação da toxicidade de metabólitos de fármacos (BAILLIE et al., 2002). Outras recomendações se seguiram como o guia de testes de segurança de metabólitos de fármacos publicado pelo FDA (FDA, 2008) e as recomendações do ICH (EMEA, 2009). De acordo com estas recomendações um metabólito deve ter sua toxicidade avaliada se sua formação exceda 10% do total de fármaco administrado ou ainda se forem observados metabólitos em humanos, que não foram detectados em estudos pré-clínicos (FDA, 2008).

Os dados apresentados acima são amplamente discutidos para medicamentos alopáticos, contudo a complexidade dos estudos se amplia muito quando pensamos na utilização de produtos fitoterápicos, que podem conter mais de uma substância ativa. A Organização Mundial de Saúde estima que entre 70-95% da população mundial, de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos (ROBINSON; ZHANG, 2011). Apesar do avanço da pesquisa em produtos naturais e no desenvolvimento de novos fármacos o número de estudos clínicos envolvendo produtos naturais ainda é pequeno. A definição das rotas de metabolismo de substâncias presentes em produtos fitoterápicos, trará uma importante contribuição para estudos toxicológicos envolvendo estes produtos.

1.2 As enzimas citocromo P450 e suas reações no metabolismo

O citocromo P450 (CYP450) compreende um conjunto de enzimas contidas no retículo endoplasmático responsáveis por parte dos mecanismos de detoxificação de um dado organismo. São classificadas como monooxigenases por transferir somente um átomo de oxigênio ao seu substrato, sendo que o outro átomo será reduzido à água. As monooxigenases estão amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em mamíferos, insetos, plantas e em leveduras (IOANNIDES, 2008). Em humanos ocorrem em diversos órgãos e tecidos sendo sua maior concentração no fígado. As CYP450 catalisam a maior parte das oxidações envolvidas nas reações de fase I do metabolismo. Seu sítio ativo contém um resíduo ferroprotoporfirina IX com o quinto ligante ocupado por um resíduo de cisteína e o sexto ligante livre, que será ocupado pelo oxigênio molecular. Os elétrons transferidos ao sistema CYP450 advêm de um complexo multienzimático associado que utiliza NADPH e NADP como agentes redutores. Este complexo é chamado de NADPH-CYP450 redutase e funciona como um carreador de elétrons (COLEMAN, 2010).

In vivo o sistema CYP450 catalisa uma série de reações como a hidroxilação de alcanos

e compostos aromáticos; a epoxidação de alcenos, hidrocarbonetos policíclicos e benzenos halogenados; a dealquilação de aminas primárias, secundárias, terciárias e éteres; a desaminação de aminas e a conversão de aminas a N-óxidos, hidroxilaminas e derivados nitrosos e a deshalogenação de hidrocarbonetos halogenados. Além disso, esse sistema catalisa a clivagem oxidativa de ésteres tiofosfatos; a sulfoxidação de tioéteres e a conversão de fosfotionatos a fosfatos. O CIP450 catalisa, embora com menos frequência, reduções como a clivagem redutiva de azo e nitro compostos a aminas primárias (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 2007). O ciclo catalítico da enzima é representado, de forma geral, pela equação 1.1 (DENISOV et al., 2005).

Sendo composto por cinco etapas:

1. Ligação do substrato e redução do ferro do estado férrico a ferroso.
2. Ligação do oxigênio molecular à porfirina.
3. Clivagem do oxigênio molecular (ativação).
4. Oxidação do substrato.
5. Liberação do produto oxidado.

A etapa um é iniciada com o átomo de ferro do grupamento prostético em estado de spin baixo e estado de oxidação igual a três (férrico) com seu sexto ponto de coordenação ligado a uma molécula de água (Figura 1.1). A ligação do substrato desloca a molécula de água ligada e uma redução, que consome NADPH, leva o complexo ao estado de oxidação ferroso (Fe^{2+}).

Na etapa dois ocorre a ligação do oxigênio em estado triplete com o ferro, formando o radical $Fe^{III}(O-O\cdot)$. Este é o último intermediário relativamente estável do ciclo. A próxima transferência de elétrons (Etapa 2) para o complexo $Fe^{III}(O-O\cdot)$ é a etapa limitante do ciclo e leva a formação de um complexo $Fe^{III}(O-O)^-$ superóxido (REEDIJK; BOUWMAN, 1999). Este complexo é protonado dando origem ao complexo ferricohidroperóxido $Fe^{III}(O-OH)$ e após uma protonação subsequente, acompanhada de uma eliminação de água, ocorre a clivagem do oxigênio molecular (Etapa 3) dando origem à espécie química que é considerada o intermediário responsável por catalisar a maioria das reações do CIP450, o complexo oxoferrilporfirina de alta valência ($Fe^{IV}O^{+}$). Entretanto,

o intermediário ferricohidroperóxido também pode ser responsável por algumas reações do CIP450 como, por exemplo, a epoxidação de alcenos e a deformilação de aldeídos (JIN; BRYSON; DAWSON, 2004). Na última etapa o complexo $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{\cdot+}$ reage com o substrato resultando no produto oxidado e água (Etapas 4 e 5).

Figura 1.1: Ciclo catalítico do citocromo P450. Adaptado de Lohmann e Karst (2008)

1.3 Sistemas oxidativos *in vitro*

Diversos modelos vêm sendo utilizados com o intuito de reproduzir *in vitro* as reações de biotransformação que ocorrem em humanos, os principais modelos biológicos são: (i) microssomas hepáticos, (ii) frações citosólicas de fígado e (iii) frações S9 de fígado (Brandon et. al. 2003). Porém, vários problemas podem ser associados ao uso destas metodologias como a necessidade de uso de animais, que são dispendiosos e necessitam do seu sacrifício e o uso de microssomas isolados que leva a um rendimento baixo e apresentam alto custo. Por este motivo os usos de sistemas biomiméticos do CIP450 envolvendo metaloporfirinas têm recebido grande atenção (LOHMANN; KARST, 2008). Estes modelos fornecem informações importantes sobre o mecanismo e possíveis rotas do metabolismo de fármacos.

Um modelo biomimético envolvendo metaloporfirinas tem dois componentes básicos: o catalisador porfirínico contendo um metal, que pode ser Fe, Mn ou Ru e um doador de oxigênio. A utilização de oxigênio molecular e um agente redutor, conforme o ciclo

catalítico da CIP450, não leva a resultados satisfatórios, pois o agente redutor empregado competirá pelo substrato na reação de oxidação. Em sistemas biológicos essa reação não ocorre, pois o agente redutor empregado doa elétrons ao sistema CIP através de proteínas carreadoras de elétrons. Alguns exemplos de doadores de oxigênio são o hipoclorito de sódio (NaOCl), o iodosilbenzeno (PhIO), o peróxido de hidrogênio e peroxiácidos como o ácido 3-cloro-peroxibenzoico (MCPBA)(REEDIJK; BOUWMAN, 1999)

Os primeiros estudos envolvendo metaloporfirinas objetivaram inicialmente entender a complexa química da catálise mediada pelas enzimas microsossomais. Em 1979 John T. Grooves publicou um artigo no qual relatava o uso da porfirina FeTPP para a oxidação catalítica de diversos hidrocarbonetos pouco reativos como o hexeno e o adamantano, utilizando como doador de oxigênio o iodosilbenzeno. Foram observados rendimentos da ordem de 50% ou mais em temperatura ambiente (GROVES; NEMO; MYERS, 1979).

Os primeiros catalisadores desenvolvidos mimetizavam o complexo de alta valência oxoferrilporfirina $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^+$ como a tetrafenil-porfirina (FeTPP) (Figura 1.2). Estes modelos de primeira geração eram facilmente oxidados e permitiam poucos ciclos catalíticos (GROVES; NEMO; MYERS, 1979). A inserção de grupamentos retiradores de elétrons nas posições meso-porfíricas reduziu a degradação destes catalisadores, além de aumentar a reatividade da espécie ferro-oxo de alta valência formada. Isso levou ao desenvolvimento das porfirinas de segunda geração como a MnTDCPP e a FeTFPPCl. Finalmente um último grupo de metaloporfirinas foi desenvolvido inserindo grupamentos eletroretiradores nas posições β -pirrólicas como $\text{Fe}(\text{TDCPP}\beta\text{Cl}_8)\text{Cl}$ (REEDIJK; BOUWMAN, 1999).

Vários fármacos têm sido oxidados por sistemas biomiméticos, e estes estudos têm mostrado que apesar de existirem limitações, as metaloporfirinas são capazes de levar a formação de metabólitos que também ocorrem *in vivo* (BERNADOU; MEUNIER, 2004). Além disso, estas reações de oxidação catalisadas por metaloporfirinas podem gerar substâncias que não são observadas *in vivo* e que podem apresentar maior atividade biológica do que o fármaco original.

Estudos com produtos naturais, realizados por nosso grupo, têm revelado este mesmo fenômeno. O metabolismo *in vitro* do ácido clorogênico, piperina, ácidos di-cafeoilquínicos e o lapachol levaram a produção dos principais produtos observados *in vivo*, bem como outras substâncias não observadas em modelos animais ou em frações microsossomais (SANTOS; IAMAMOTO; LOPES, 2008; NIEHUES et al., 2012; SCHAAB et al., 2010). A maior parte desses produtos normalmente são reações sequenciais de oxidação chegando a

algumas vezes na obtenção de produtos tetra-oxidados, o que demonstra a necessidade de um estudo detalhado e cuidadoso visando otimizar o sistema de obtenção do metabólito para posteriores estudos pré-clínicos.

Figura 1.2: Exemplos de metaloporfirinas e catalisadores de salen utilizados como modelos biomiméticos

1.4 Modelo em estudo: ácido caurenico

O ácido caurenico (Figura 1.3) é um diterpeno isolado de diversas plantas originárias da América Central e do Sul, como por exemplo: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip, (Asteraceae), popularmente conhecidas como "guaco" (VILEGAS; MARCHI; LANÇAS, 1997; GASPARETTO et al., 2010) e de *Tithonia diversifolia* (Helms.) A. Gray (Asteraceae) (ALVES et al., 2007). Outros trabalhos também descrevem seu isolamento de plantas do gênero *Acanthopanax* originários de países como Coréia, Japão,

Tabela 1.1: Teores de ácido caurenóico encontrados em diferentes espécies de plantas

Espécie vegetal	Parte da planta	Teor	Referências
<i>Mikania glomerata</i>	Partes aéreas	0.2	VILIEGAS <i>et. al.</i> 1997
	Flores	0.1	BRESCIANI <i>et. al.</i> 2004
<i>Wedelia paludosa</i>	Folhas	0.11	
	Caule	0.50	
<i>Annona glabra</i>	Partes aéreas	0.85	BATISTA <i>et. al.</i> 2005
	Cascas	0.53	OLIVEIRA <i>et. al.</i> 2002
	Folhas	0.27	
<i>Xylopiá brasiliensis</i>	Folhas	0.01	
<i>Xylopiá aromática</i>	Folhas	0.02	MELO <i>et. al.</i> 2001
<i>Xylopiá frutescens</i>	Folhas	0.01	

China e Rússia, dentre elas destacam-se: *A. trícodon* Nakai (Araliaceae) e *A. koreanum* (KIM; CHUNG; SANKAWA, 1988). Foi relatado o isolamento desta substância dos frutos verdes de *Xylopiá frutescens* Aubl. (Annonaceae) e *X. brasiliensis* e *X. aromática*, além das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC.(Asteraceae) (VIEIRA; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2001). O ácido caurenóico também foi isolado nas frações fixas de óleos de copaíbas (*Copaífera ssp.* (Fabaceae) (BIAVATTI *et al.*, 2006) e *Annona glabra* (Annonaceae) (OLIVEIRA; SANT'ANA; BASTOS, 2002). A tabela 1.1 sumariza a ocorrência de ácido caurenóico em diferentes espécies e a sua concentração em cada parte da planta.

Figura 1.3: Estrutura química do ácido caurenóico

O ácido caurenóico tem mostrado propriedades antimicrobiais, citotóxicas, antiinflamatórias e antiprotozoárias (GARCÍA; OLIVEIRA; BATISTA, 2007). Este diterpeno também apresenta efeitos relaxante na musculatura lisa, (PAIVA *et al.*, 2002) antifúngico, (COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004) e atividade contra forma tripomastigota de *T. cruzi* com CI₅₀ de 0,5 mg/mL (1,66 mM) em ensaios *in vitro* (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005). Recentemente foi demonstrada a atividade antinociceptiva do ácido caurenóico em modelos animais. Foi descrita a inibição de citocinas inflamatórias como a

TNF- α e IL-1 β de maneira dose-dependente. Além disso, o tratamento com doses orais de 10mg/kg não induziu o aumento dos níveis plasmáticos das enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, indicando que o tratamento dos animais com ácido caurenoico não induziu a danos hepáticos agudos (MIZOKAMI et al., 2012). Neste contexto, este diterpeno foi considerado um bom alvo para os estudos propostos, uma vez que apresenta inúmeras atividades biológicas relatadas em produtos fitoterápicos consumidos pela população brasileira, e também carência de informações relativas a estudos de metabolismo de fase I.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como principal objetivo estudar a oxidação do diterpeno ácido caurenóico em diferentes sistemas *in vitro*. Deverão ser utilizadas metaloporfirinas e reagentes de salen como catalisadores biomiméticos e microsomas hepáticos.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma fonte para o isolamento do ácido caurenóico em quantidades suficientes para este trabalho
- Desenvolver metodologias analíticas para a identificação e separação do ácido caurenóico e seus metabólitos nas matrizes estudadas
- Realizar reações de oxidação utilizando catalisadores metaloporfirínicos, reagentes de salen e microsomas hepáticos
- Estudar a influência de diferentes oxidantes e catalisadores na reatividade do ácido caurenóico
- Identificar os metabólitos obtidos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e equipamentos utilizados

- Todos os solventes e o modificador de fase móvel ácido acético, utilizados para as separações em cromatografia líquida, foram grau HPLC da marca J.T.Baker.
- O material vegetal foi coletado, separado e estabilizado em estufa de ar circulante a 40°C e então moído em moinho de facas. Foi concedida a autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético, obtida junto ao CNPq, processo: 010143/2011-4
- Todos os solventes utilizados para as colunas cromatográficas foram destilados previamente. Foi utilizada sílica de granulometria 63 μ -200 μ m da empresa Sigma Aldrich. Para as análises em cromatografia em camada delgada comparativa foram utilizadas placas contendo fase estacionária de sílica em suporte de alumínio da marca Watmann.
- Os rotaevaporadores utilizados foram da marca IKA
- A água tipo I foi obtida através de um equipamento marca MilliQ.
- Foi utilizado um polarímetro da marca Jasco para a medida do valor de rotação específica $\alpha[D]$.
- Os oxidantes PhIO e mCPBA foram adquiridos da empresa Acros Organics, o H₂O₂ da empresa Sigma-Aldrich. O PhIO foi sintetizado e purificado a partir do iodo-silbenzenodiacetato pelo aluno M.e. Leandro de Santis Ferreira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e sua pureza foi de 85% determinada por titulação iodométrica de acordo com os métodos descritos por Saltzman e Sharefkin (1963) e Lucas, Kennedy e Formo (1955).
- As porfirinas utilizadas foram adquiridas comercialmente da empresa Frontier Scientific, metalados e purificados pela Dra. Valeria Priscila De Barros da Faculdade

de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP(FFCLRP). As metaloporfirinas imobilizadas em suportes inorgânicos foram gentilmente cedidas pelo Dr. André Luiz de Faria da FFCLRP. Estes experimentos foram realizados com o suporte do laboratório coordenado pela Profa. Dra. Marilda das Dores de Assis da FFCLRP.

- Para o isolamento dos microsomas hepáticos foram utilizados ratos Wistar que foram obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP). A autorização para experimentação em animais foi concedida do Comitê de Ética do Campus da USP- Ribeirão Preto (CEUA) com o número de protocolo: 10.1.408.53.2.

3.2 Isolamento do ácido caurenoico

Apesar da ampla ocorrência do ácido caurenoico em plantas (GARCÍA; OLIVEIRA; BATISTA, 2007) a escolha da matriz para o seu isolamento deve ser realizada de forma criteriosa. A matriz ideal deve conter o ácido caurenoico de forma majoritária e também apresentar ausência de outros cauranos análogos afim de simplificar o número de etapas de fracionamento dos extratos obtidos. Além disso, deve ocorrer em uma planta ou parte da planta que esteja acessível para coleta e disponível em abundância. Dentre as diversas estratégias de isolamento foram avaliadas o isolamento a partir de frações fixas de óleo de copaíba e de partes aéreas de *Wedelia paludosa*.

3.2.1 Isolamento a partir de *Copaifera ssp*

As frações fixas de *Copaifera ssp* foram obtidas através de fracionamento do óleo bruto de copaíba realizado pelo Prof. Dr. Oswaldo de Freitas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 2009. No curso deste fracionamento a fração volátil do óleo era utilizada para estudos farmacológicos e a fração fixa era desprezada. Devido a disponibilidade destas frações fixas e a ocorrência de ácido caurenoico nesta fração, ela foi escolhida para o processo inicial de isolamento(JUNIOR; PINTO, 2002).

Uma alíquota de 10g da resina bruta foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna clássica utilizando sílica gel (100g) como fase estacionária e Hexano:AcOEt 99:1 como fase móvel. Durante a realização da coluna foram coletadas 10 frações de 500mL que tiveram sua composição analisada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC. Para as análises de CCDC foi utilizado placas da marca Watmann de sílica gel F254 (4x2cm e 250 μ m de espessura) e como eluente uma mistura Hexano:AcOEt 8:2,

vanilina sulfúrica ou anisaldeído sulfúrico foram utilizados como reveladores. A substância de interesse eluiu nas frações 3-7 Hexano:AcOEt 99:1. Após sucessivas recristalizações com MeOH grau HPLC foram obtidos dois sólidos compostos por misturas do ácido caurenoico e do ácido cauranoico. Após análise por CG-EM a primeira mistura apresentou sinais cromatográficos com proporção de 4:1 de ácido caurenoico e ácido cauranoico (230mg), e o segundo apresentou maior proporção do ácido cauranoico (1:1). Este último sólido foi analisado por RMN utilizando um equipamento da marca Bruker DRX operando em 500MHz. Os espectros foram obtidos em CDCl₃.

3.2.2 Isolamento a partir de *Wedelia paludosa*

A espécie *Wedelia paludosa* DC.(syn. *Sphagneticola trilobata*(L.)Pruski, *Acmella brasiliensis* SPRENG) é uma espécie nativa brasileira, não endêmica e pertencente a família Asteraceae tribo Heliantheae (MONDIN; JR., 2012). Estudos fitoquímicos nesta espécie descreveram a presença de terpenos e esteroides como os principais constituintes, a presença de flavonoides principalmente nas folhas e flores e a ausência de alcalóides (VIEIRA; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2001). Diversos trabalhos apontam para a ocorrência de ácido caurenoico em todas as partes da planta com maior concentração nas suas partes aéreas (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; BRESCIANI; CECHINEL-FILHO; YUNES, 2000).

Esta espécie ocorre em todas as Américas, e no Brasil nos estados do norte (Amapá, Amazonas e Acre), nordeste (Ceará e Bahia), sudeste (São Paulo) e sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) sendo muito frequente em regiões litorâneas (MOBOT-Missouri Botanical Garden, 2013). Para este estudo foram coletadas as partes aéreas de *W. paludosa* no interior do campus da USP-RP, nas imediações do Balão Central. Uma exsicata foi depositada no herbário da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP-FFCLRP e identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo da FFCLRP. As partes aéreas foram coletadas e separadas manualmente das folhas doentes e flores. A separação das flores teve o intuito de simplificar o isolamento do ácido caurenoico, pois ocorrem nas flores, o ácido caur-9(11),16-dien-19-oico e isso poderia adicionar mais passos de purificação no isolamento da substância alvo (CARVALHO et al., 2001).

Após coleta, secagem e moagem, 300g do material vegetal foi extraído por maceração sucessiva com 1L de Hexano 100% por quatro vezes. Após a remoção do solvente por evaporação, foi obtido um resíduo (WPH1, 9,5 g). Uma parte deste resíduo (3g) foi submetida a fracionamento em sílica gel (150g), utilizando uma coluna líquida a vácuo (CLV),

empregando um gradiente de polaridade crescente com Hexano, AcOEt e MeOH. Foram coletadas sete frações, conforme a Tabela 3.1. As frações foram analisadas por CCDC e

Tabela 3.1: Fracionamento em CLV da fração WPH1

Eluente	Proporção	Massa(<i>mg</i>)obtida	Volume coletado(L)
Hexano	100%	7,5	2
Hexano:AcOEt	9:1	593,4	1
Hexano:AcOEt	9:2	1005	1
Hexano:AcOEt	9:3	552	1
Hexano:AcOEt	1:1	401	1
AcOEt	100%	123	1
MeOH	100%	80	2

por CG, sendo que o ácido caurenóico foi encontrado nas frações Hexano:AcOEt 9:1 e 9:2. Estas frações foram reunidas e lavadas diversas vezes com EtOH gelado. Esta lavagem resultou em um precipitado branco que foi descartado e um sobrenadante, que foi seco em nitrogênio (WPH1-HA, 1,32g). A fração WPH1-HA foi solubilizada em MeOH:AcOEt 1:1 e aplicada em uma coluna de exclusão contendo Sephadex-LH20 (80g) como fase estacionária e MeOH:AcOEt 1:1 como eluente. Foram coletadas 30 frações de 5mL que foram analisadas por CCDC. As frações 20-24 mostraram a presença de ácido caurenóico. Estas frações foram recristalizadas sucessivamente até que não fossem mais observados contaminantes de menor R_f nas análises por CCDC. Foi possível, então, o isolamento de 178mg de ácido caurenóico com pureza cromatográfica, determinada por CG-EM, de 99%.

3.3 Metodologias analíticas

3.3.1 Cromatografia em camada delgada comparativa.

Para o acompanhamento dos procedimentos de purificação do ácido caurenóico foram utilizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada comparativa(CCDC) . As análises em CCDC foram realizadas utilizando fase móvel composta por Hexano:AcOEt 8:2 e fase estacionária composta por sílica gel 60H com espessura de $250\mu\text{m}$ Watmann de sílica gel F254. Como revelador foram utilizados vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico, sendo que o procedimento de preparo destes reveladores e a própria revelação foi realizado como descrito em Wagner e Bladt (1996).

3.3.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

Para a análise da pureza das substâncias obtidas e para a avaliação qualitativa das reações biomiméticas foi utilizada a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um aparelho Shimadzu CG-EM QP2010 com o autoinjeter e autoamostrador AOC5000 equipado com fonte de ionização por elétrons. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida ZB5MS de 30m 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária. Previamente às injeções, as amostras foram derivatizadas utilizando 50 μ L (188 μ mol) de uma mistura de 1mL do reagente N-O-bis(trimetilsilil)tetrafluoroacetamida (BSTFA) com 200 μ L de trimetilcloro-silano em piridina (reagente derivatizante). As amostras são aquecidas por 20min a 75°C e os derivados trimetilsililados são analisados de acordo com o método descrito na tabela 3.2:

Tabela 3.2: Parâmetros experimentais utilizados no método de análise 1 por CG-EM

Parâmetro	Valor
Temperatura de injeção	250°C
Programação de temperatura	100°C por 2min, rampa de aquecimento de 15°C/min até 200°C, rampa de 6°C/min até 230°C, patamar mantido por 2min e rampa de 15°C/min até 280°C com patamar até 39'
Tipo de fase estacionária	Phenomenex ZB-5. 5% de fenil em dime-tilsiloxane
Gás de arraste	Hélio
Fluxo do gás de arraste	34,6mL/min
Divisão do fluxo do injetor	<i>split</i> 1:20

Também foi avaliada a possibilidade de análise dos meios reacionais sem a derivatização prévia. Para isso foi utilizado o método 2 descrito na tabela 3.3:

3.3.3 Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* e a arranjo de diodos (CLUE-EM/EM)

Além da metodologia analítica utilizando o CG-EM, também foi utilizada a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (ESI).

Tabela 3.3: Parâmetros experimentais utilizados no método de análise 2 (sem derivatização) por CG-EM

Parâmetro	Valor
Temperatura de injeção	260°C
Programação de temperatura	200°C por 12min, rampa de aquecimento de 10°C/min até 290°C, patamar mantido por 20min com tempo de análise de 41min
Tipo de fase estacionária	Phenomenex ZB-5. 5% de fenil em dimetilsiloxane
Gás de arraste	Hélio
Fluxo do gás de arraste	24.7mL/min
Divisão do fluxo do injetor	<i>split</i> 1:25

Devido a menor transferência de energia no processo de ionização, em relação ao detector de ionização por elétrons, a ionização por ESI leva a uma menor fragmentação dos íons gerados, o que permite o estabelecimento da massa molecular dos analitos através da observação da molécula protonada, ou cationizada, no modo positivo de ionização ou desprotonada, ou anionizada no modo negativo. Para estas análises foi utilizado um equipamento Acquity (Waters) acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo eλ e a um espectrômetro de massas Waters TQD com fonte de ionização por eletrospray e um analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo. Para as análises de massas sequenciais foi utilizado argônio como gás de colisão. Os parâmetros do detector de espectrometria de massas estão descritos na tabela 3.4.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC híbrida BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, com tamanho de partícula de 1.7μm a um fluxo de 0,3 mL/min, utilizando um volume de injeção de 3μL. As análises foram monitoradas inicialmente no modo *full-scan* do detector de massas, e então os sinais desejados foram selecionados para dissociação induzida por colisão (CID). Foi utilizado um gradiente de eluição com o programa: (A) água contendo 0.1% de ácido acético; (B) acetonitrila contendo 0.1% de ácido acético. 30% B a 100% B em 5' e então 100% B por 2'.

3.3.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) e de carbonos (¹³C-RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, foram adquiridos em espectrômetros Avance DRX-500 e 400 Bruker operando em 500MHz e 400MHz. Os deslocamentos químicos estão apresentado em partes por milhão (ppm) relativos ao deslocamento do solvente utilizado,

Tabela 3.4: Parâmetros do detector TQ

Parâmetro	Valor
Voltagem do capilar (kV)	2.5
Voltagem do cone (V)	25
Voltagem do extrator(V)	3
RF lens	0.1
<i>Source temp</i> °C	150
<i>Dessolvation temp</i> °C	350
<i>Dessolvation gas flow</i> L/h	650
Fluxo de gas do cone L/h	50

podendo ser CDCl_3 ($\delta=7.24$ ppm para espectros de ^1H e 77.0 ppm para espectros de ^{13}C) ou do Metanol- d_4 ($\delta= 3.31$ ppm e 4.84 ppm ppm para espectros de ^1H e 49.0 ppm para espectros de ^{13}C).

3.4 Reações oxidativas

Os experimentos foram realizados em colaboração com a Dra. Valeria Priscila de Barros da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP. Os dados destes experimentos foram tratados utilizando o pacote estatístico R (R Development Core Team, 2011) e as áreas dos sinais estudados (substrato e produtos) foram importadas diretamente dos arquivos brutos do software do cromatógrafo GC Solution através de um algoritmo que encontra-se no Apêndice A.

3.4.1 Catálise homogênea

Os catalisadores utilizados nestes experimentos foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Marilda Das Dores Assis da FFCLRP-USP. Os catalisadores de Salen (*S,S*-Salen e *R,R*-Salen) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich já metalados e purificados. Os catalisadores porfirínicos foram obtidos comercialmente da empresa Frontier Scientific, metalados e purificados de acordo com o método descrito em Barros (2008). A estrutura química destes catalisadores está mostrada na figura 1.2

Foram utilizados dois sistemas reacionais que diferem entre si por sua composição, volume reacional e pela forma de agitação dos frascos. O primeiro sistema (sistema 1) consistia em misturas reacionais de 1,5 mL em DCM que continham a mistura catalisador:oxidante:substrato na proporção molar 1:60:40 com o catalisador na concentração

de 0.06mM. Estes experimentos foram realizados com agitação magnética à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar e tendo como tempo de reação 24h. No sistema 1 foi avaliada a influência do tipo de catalisador e a influência do tipo de oxidante, foram utilizados os catalisadores: Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III (FeTFPP), Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina manganês III (MnTFPP), Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina ferro III (FeTDCPP), Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina manganês III (MnTDCPP), Cloreto de (*R,R*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*tert*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III (*R,R*-Salen) e Cloreto de (*S,S*)-(-)N,N'-bis(3,5-di-*tert*-butil-salicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III (*S,S*-Salen), além dos oxidantes: Iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), *tert*-butil-hidroperóxido (TBHP) e ácido 3-cloro-peroxibenzoico (MCPBA).

As reações do sistema 1 foram analisadas por CG-EM utilizando o método 1 na tabela 3.2, seção 3.3.2. Logo após as reações os meios foram secos e armazenados em freezer a -20°C. Aos meios secos foram adicionados 200μL de piridina anidra, e a 100μL desta solução foi adicionado 50μL do reagente derivatizante BSTFA (detalhes na seção 3.3.2), aquecidos por 20min a 75 °C e analisados.

O outro sistema (sistema 2) foi constituído de 500μL de uma mistura reacional na proporção molar catalisador:oxidante:substrato de 1:60:40, com concentração de catalisador de 0.3 e 0.03mM em três solventes: ACN, MeOH e DCM. Foram utilizados os catalisadores FeTPP e *S,S*-Salen e os oxidantes MCPBA e PhIO. Houve a necessidade de se desenvolver um meio reacional com menor volume total, para que houvesse menor consumo do substrato e dos reagentes. Os experimentos foram realizados em microtubos de vidro de 1,5mL mantidos sob agitação em um banho *Dubnoff* à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar e tendo como tempo de reação 24h. No interior dos microtubos foram adicionadas esferas de vidro para auxiliar na agitação dos meios durante a reação. Neste experimento foi avaliada a influência do tipo de solvente do meio reacional, a influência da concentração dos reagentes no meio e também a influência dos oxidantes e catalisadores já citados na reatividade e na formação dos produtos observados.

As reações do sistema 2 foram analisadas por CG-EM utilizando o método 1 na tabela 3.2, seção 3.3.2. Logo após as reações os meios foram secos e armazenados em freezer. Aos meios secos foram adicionados 50μL de piridina e 50μL do reagente derivatizante BSTFA (detalhes na seção 3.3.2), aquecidos por 20min a 75 °C e analisados.

3.4.2 Catálise heterogênea

Os catalisadores porfirínicos foram obtidos comercialmente da empresa Frontier Scientific, metalados e purificados de acordo com o método descrito em Barros (2008). A imobilização nos suportes inorgânicos foi realizada pelo Dr. André Luiz De Faria de acordo com metodologia descrita em Faria (2010). Foram utilizados o cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III imobilizado em sílica modificada com 1,6-diaminohexil(FeTFPP/DaHS), o cloreto de 5,10,15,20-tetraquis-(4-N-metilpiridil)porfirina ferro III imobilizado em argila montmorilonita (FeTMPyP/mont) e o 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina ferro III imobilizado em 3-aminopropil sílica (FeTFPP/APS). Foi utilizada a proporção catalisador, oxidante, substrato de 1:40:40, 1,5mL de DCM como solvente e concentração de catalisador de 0.06mM e as reações foram conduzidas por 24h.

Após a reação os meios foram secos para armazenamento. No mesmo dia em que foram analisados os meios foram submetidos a dois procedimentos de análise: no primeiro os meios foram lavados com 3X 1mL de MeOH e filtrados. O filtrado foi, então, seco, adicionado 200 μ L de piridina e derivatizado. No segundo os meios foram ressuspensos em 200 μ L de piridina, filtrados e derivatizados.

3.4.3 Catálise utilizando microsossomas hepáticos

O isolamento dos microsossomas hepáticos e a realização dos ensaios catalíticos foram realizado em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira da FFCLRP-USP. Os microsossomas foram obtidos através de centrifugações sucessivas de homogenato de fígados de ratos Wistar, seguindo metodologia descrita por Santos (2006). Os microsossomas foram incubados em tubos de ensaio de 10mL mantidos a 37°C e em agitação. Os tubos testes continham 650 μ L de tampão fosfato (pH 7,4), 100 μ L dos microsossomas (conc. final de 2mg/mL determinado através do método do biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949), 25 μ L de substrato (1.5mg/mL), 100 μ L dos cofatores NAD⁺ e glucose 6-fosfato e 50 μ L de glucose 6-fosfato-deshidrogenase. Após a adição da suspensão de microsossomas, a reação foi incubada por 1.5h e então foram interrompidas pela adição de 3 x 4mL de AcOEt. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi seco e a ele foi adicionado 50 μ L do reagente derivatizante e 150 μ L de piridina anidra, aquecidos a 75°C por 20min e analisados por CG-EM utilizando o método 1 de análise descrito na seção 3.3.2. Foram utilizados dois controles, um deles incubado sem a presença do substrato e outro sem a presença dos cofatores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento do ácido caurenoico a partir de *Copaifera ssp*

A primeira matriz utilizada para o isolamento do ácido caurenoico foi a fração fixa das resinas de copaíba. Esta fração foi purificada utilizando coluna clássica de sílica e uma mistura de Hexano:AcOEt 99:1 como fase móvel. Foram recolhidas 10 frações de 500mL, sendo as frações 3-7 foram analisadas em CCDC de acordo com método utilizado na seção 3.3.1 e apresentaram manchas roxas de R_f 0,3. As análises de CCDC foram realizadas concomitantemente à eluição da coluna, e assim que os compostos de interesse não foram mais detectados, a coluna foi interrompida com a eluição de 2L de MeOH.

Após sucessivas recristalizações com MeOH grau HPLC foram obtidos dois sólidos compostos por misturas do ácido caurenoico e do ácido cauranoico, sendo este último já isolado no gênero *Copaifera*, nas espécies *Copaifera paupera* (TINCUSI et al., 2002) e *Copaifera langsdorfi* (FERRARI et al., 1971). Após análise por CG-EM, a primeira mistura apresentou sinais cromatográficos com proporção de 4:1 de ácido caurenoico e ácido cauranoico (230mg) figura 4.1A, e a segunda apresentou maior proporção do ácido cauranoico (1:1) figura 4.1B. Foram adquiridos os dados de RMN de 1H , ^{13}C e DEPT 135 da mistura 1:1 mostrada na Figura 4.1. Os espectros estão ilustrados nos Anexos A e B. A estrutura do ácido cauranoico pode ser sugerida com base no perfil de fragmentação observado no seu espectro de massas. Os primeiros cinco íons do espectro do ácido cauranoico (304, 289, 271 e 259) também apareceram no espectro do ácido caurenoico com diferença de 2u confirmando a ausência da ligação dupla (Figura 4.3).

Para confirmar a hipótese da presença do ácido cauranoico na mistura foi realizada uma operação de subtração entre os espectros de 1H da mistura ácido caurenoico:ácido cauranoico e o espectro de 1H do ácido caurenoico puro isolado posteriormente. O resultado é mostrado na figura 4.2. Pode-se notar um dubleto em $\delta = 1,01$ ppm e $J = 7$ Hz,

Figura 4.1: Cromatograma dos produtos isolados a partir de resinas de *Copaifera ssp*.

que correspondeu aos valores encontrados por Ferrari et al. (1971) ($\delta=1,04\text{ppm}$, $J= 6$ Hz).

Como o acesso às frações fixas do óleo de copaiba foi dificultado, e o produto obtido requer etapas complementares de isolamento para a separação do ácido cauranoico do ácido caurenoico, foi avaliada outra matriz que pudesse fornecer quantidades suficientes de substrato para este estudo. Esta matriz deve ser de fácil e abundante coleta e ter como metabólito majoritário o ácido caurenoico.

Figura 4.2: Espectro resultante da subtração do espectro de ^1H da mistura ácido caurenóico:ácido caurenóico com o espectro de ^1H do ácido caurenóico puro

Figura 4.3: Espectro de massas dos produtos isolados a partir de resinas de *Copaifera ssp*.

4.2 Isolamento do ácido caurenoico a partir de *Wedelia paludosa*

O fracionamento em coluna foi acompanhado por cromatografia em fase gasosa e os resultados estão mostrados na figura 4.4. Comparando o perfil de fragmentação do ácido

Figura 4.4: Cromatogramas obtidos por CG-EM das frações purificadas por CLV do material de partida (extrato hexânico WPH1) e espectro de massas do sinal com tempo de retenção de 16,7 min correspondente ao ácido caurenoico derivatizado

caurenoico derivatizado (TMS) com o disponível na biblioteca do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos-FCFRP-USP foi possível identificar a presença desta substância no extrato. As frações Hex:AcOEt 9:1 e Hex:AcOEt 9:2 mostraram a presença deste composto, mas também outros contaminantes. Estas frações foram reunidas e lavadas com EtOH gelado para a precipitação de substâncias de menor polaridade. Este precipitado foi descartado.

A fração solúvel em EtOH foi então seca em fluxo de nitrogênio, dissolvida em uma mistura MeOH:AcOEt 1:1 e cromatografada utilizando Sephadex-LH20 como fase esta-

cionária e MeOH:AcOEt 1:1 como fase móvel. Após análise por CCDC as frações 20-24 apresentaram manchas roxas com Rf 0,3. Estas amostras foram recristalizadas utilizando metanol e a fração 23 resultou em 178mg de ácido caurenoico com pureza cromatográfica de 99% e valor de rotação específica α_D de $-97,5^\circ$ (c.10mg/mL, 28°C) A figura 4.5 mostra o seu cromatograma. Para a confirmação da identidade química do ácido caurenoico foram

Figura 4.5: Cromatograma e espectro de massas do ácido caurenoico obtido após purificação em coluna

adquiridos dados de ^1H e ^{13}C RMN. Os valores encontram-se na tabela 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1: Dados de ^1H -RMN do produto isolado e valores da literatura

Hidrogênio	Ácido cau- renoico isolado(ppm)	BATISTA <i>et. al.</i> , 2007(ppm)	SILVA <i>et. al.</i> , 1999(ppm)
13	2,64(1H, <i>m</i>)	2,64(1H, <i>m</i>)	2,62(1H, <i>m</i>)
17a	4,80(1H, <i>s</i>)	4,79(1H, <i>s</i>)	4,78(1H, <i>s</i>)
17b	4,74(1H, <i>s</i>)	4,73(1H, <i>s</i>)	4,72(1H, <i>s</i>)
18	1,25(3H, <i>s</i>)	1,24(3H, <i>s</i>)	1,23(3H, <i>s</i>)
20	0,96(3H, <i>s</i>)	0,95(3H, <i>s</i>)	0,94(3H, <i>s</i>)

Tabela 4.2: Dados de ^{13}C -RMN do produto isolado e valores da literatura

Carbono	Ácido cau- renoico isolado(ppm)	BATISTA <i>et. al.</i> ,2007(ppm)	SILVA <i>et. al.</i> ,1999(ppm)
1	41,1	40,7	40,7
2	19,5	19,1	19,1
3	38,2	37,7	37,7
4	44,1	43,2	43,2
5	57,5	57,1	57,0
6	22,2	21,8	21,8
7	41,7	41,3	41,3
8	44,6	44,2	44,2
9	55,5	55,1	55,1
10	40,1	39,7	39,7
11	18,8	18,4	18,4
12	33,5	33,1	33,1
13	44,3	43,8	43,8
14	40,1	39,7	39,7
15	49,3	48,9	48,9
16	156,3	155,9	155,8
17	103,4	103,0	103,0
18	29,4	29,0	28,9
19	184,9	184,8	184,9
20	16,0	15,6	15,6

4.3 Metodologias analíticas

O estudo da oxidação de terpenos apresenta algumas dificuldades em relação à metodologia de análise do substrato e dos produtos. Particularmente para o ácido caurenoico, a ausência de grupos cromóforos com absorção em regiões acima de 230nm resulta em baixos limites de quantificação para a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de ultravioleta(UV). Entretanto, alguns autores descreveram o uso desta técnica para a determinação do teor de ácido caurenoico em diferentes matrizes com valores de limite de detecção inferiores a $1\mu\text{g}$. Os detalhes e limitações destas técnicas serão apresentadas a seguir.

Batista, Braga e Oliveira (2005) desenvolveram uma metodologia para a quantificação de ácido caurenoico e ácido grandiflorênico em partes aéreas de *W. paludosa* utilizando CLAE acoplado um detector de ultravioleta (UV) em 220nm e uma mistura de acetonitrila:água 6:4 em modo isocrático. Foi encontrado o limite de quantificação de $1,25\mu\text{g}$ para o ácido caurenoico e $0,65\mu\text{g}$ para o ácido grandiflorênico no entanto, a resolução de

ambos os sinais apresentou valores de resolução abaixo de 1, o que pode indicar que os sinais não estão totalmente separados e outros componentes da matriz.

Bertolucci et al. (2009) desenvolveu uma metodologia utilizando CLAE-UV para a quantificação de ácido caurenóico, ácido o-cumárico, ácido benzoilgrandiflórico e ácido cinamoilgrandiflórico, presentes em folhas de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*. O limite de quantificação para o ácido caurenóico foi de $0,8\mu\text{g}$ utilizando o detector UV em 230nm e houve boa separação entre os sinais adjacentes. Embora os valores dos limites de quantificação não impeçam o uso de métodos por CLAE para o presente estudo, optou-se pela utilização da técnica de cromatografia em fase gasosa. Esta opção se deu principalmente pela possibilidade de acoplamento do sistema cromatográfico com o detector de espectrometria de massas com ionização por elétrons, que pode fornecer informações estruturais importantes sobre os terpenos analisados. Além disso, o uso de colunas cromatográficas mais longas em cromatografia em fase gasosa permite uma maior eficiência na separação cromatográfica possibilitando a detecção de produtos de oxidação estruturalmente semelhantes.

Utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas foi inicialmente desenvolvida a metodologia 2 descrita na tabela 3.3, seção 3.3.2. A utilização deste método resultou em um sinal para o ácido caurenóico pouco simétrico e com cauda, conforme mostrado na figura 4.6

De acordo com estudos prévios, derivados hidroxilados podem ser obtidos na oxidação do ácido caurenóico. Os trabalhos de Marquina et al. (2009), Silva et al. (1999) e Tavepanich et al. (2010) descreveram a obtenção de derivados mono-, di- e tri-hidroxilados em reações de biotransformação utilizando fungos. A presença deste grupamento poderia aumentar a retenção do ácido caurenóico, resultando em um sinal mais assimétrico e com baixa resolução. Foi desenvolvida, então, uma metodologia de derivatização para a análise utilizando o reagente N,O-bis(trimetilsilil)trifluorocetamida (BSTFA). O BSTFA é capaz de formar derivados trimetilsililados em compostos que possuem hidrogênios ácidos como ácidos carboxílicos, alcoóis, fenóis, aminas primárias e secundárias (WATSON; SPARKMAN, 2008). Os sinais cromatográficos de produtos trimetilsililados apresentam menor formação de cauda, e maior resolução. Além disso, como o BSTFA não reage com éteres, cetonas e epóxidos, este método de análise permite diferenciar os produtos hidroxilados e epoxidados, que serão isômeros, pelo valor da massa molecular do produto derivatizado. Epóxidos resultarão em um sinal com um incremento de 88u $[\text{M-H}+\text{SiCH}_3+16(\text{O})]$ correspondente a derivatização apenas, da hidroxila do grupamento ácido. Já os derivados

Figura 4.6: Cromatograma representativo da análise por CG-EM de uma reação sem derivatização

hidroxilados resultarão em um incremento de massa de 160u $[M-2H+2(SiCH_3)+16(O)]$ correspondente a derivatização do grupamento ácido mais o grupamento hidroxil.

A figura 4.7 mostra um cromatograma onde foi utilizado a metodologia de análise sem a derivatização (A) e com derivatização (B). O material analisado foi obtido após reação utilizando o catalisador FeTFPP e PhIO como oxidante na proporção catalisador, oxidante, substrato, de 1:60:40 e tendo como solvente DCM. O tempo reacional foi de 24h. Pode-se observar que não é possível a definição de nenhum sinal analítico quando o meio não é derivatizado. Uma possível causa é a baixa volatilidade de derivados caurânicos hidroxilados, ou mesmo o aumento da assimetria dos sinais após a oxidação. Já o cromatograma do meio derivatizado apresenta sinais bem resolvidos e com pouca formação

de cauda. Portanto, para todos os experimentos subsequentes os meios reacionais foram analisados utilizando o método 1 descrito na tabela 3.2 seção 3.3.2.

Figura 4.7: Cromatograma representativo da análise do ácido caurenóico sem derivatização (A) e com derivatização (B)

4.4 Caracterização dos produtos de oxidação do ácido caurenóico

Após análise por CG-EM foram encontrados diversos sinais com tempo de retenção superior ao do ácido caurenóico. No entanto, somente três destes produtos estão relacionados com produtos de oxidação do ácido caurenóico. A figura 4.8 mostra um cromatograma representativo com a indicação dos produtos encontrados. A identificação da estrutura química de cada um dos produtos foi proposta através do perfil de fragmentação dos sinais cromatográficos encontrados e é apresentada abaixo.

Figura 4.8: Cromatograma representativo da análise por CG-EM de uma reação de oxidação

Como não existem dados da literatura a cerca dos seus possíveis produtos de metabolismo em humanos, foram buscados sinais cromatográficos correspondentes a perfis de fragmentação com semelhança aos de diterpenos e também sinais correspondentes a produtos de oxidação já observados em outras reações, envolvendo fungos (TAVEEPANICH et al., 2010; PECHWANG et al., 2010) e oxidantes como o MCPBA (BATISTA et al., 2007).

Em 1971 Kalinovskii et al. (1971) realizaram um estudo sistemático sobre fragmentação do ácido caurenóico e derivados utilizando a espectrometria de massas com ionização por elétrons. Esse trabalho pioneiro revelou que os diterpenos caurânicos apresentam fragmentos típicos como a eliminação de um metil radical (-15 u), e eliminações com perdas de 43 e 59u, todas a partir do íon molecular. O espectro do produto di-deuterado no carbono C₁₇ revelou, como esperado, a mesma eliminação de 15u a partir do íon molecular relativa a perda do radical metil, contudo, ao invés das eliminações de 43 e 59u foram observadas

eliminações de 45 e 61u confirmando a eliminação de parte dos carbonos do anel D. Esses dados permitiram aos autores sugerirem que os íons $[M-43]^+$ e $[M-59]^+$ podem resultar de clivagens entre os carbonos C₁₇-C₁₆ ou ainda entre os carbonos C₈-C₁₅ e C₁₃-C₁₆ envolvendo uma quebra complexa que não foi totalmente elucidada no estudo. Em relação às análises do ácido caurenoico derivatizado com BSTFA devemos levar também em consideração fragmentações específicas do derivatizante. Para os produtos derivatizados de ácidos carboxílicos com BSTFA, podem ocorrer eliminações de metil radicais do derivado trimetilsililado formado um íon siloxônio (Figura 4.9-A). A descarboxilação subsequente do íon de m/z 359 origina um carbocátion terciário de $m/z=257$ (Figura 4.9).

Os sinais de m/z próximos a 100 no espectro do produto derivatizado (Figura 4.11) parecem resultar de uma clivagem do anel B do esqueleto caurânico. De acordo com a figura 4.9-B a quebra das ligações entre os carbonos C₉-C₁₀ e a clivagem subsequente entre os carbonos C₅-C₆ ou C₆-C₇ resultam nos íons A (A1 $m/z=148$ e A2 $m/z=109$) e os íons B (B1 $m/z=135$ e B2 $m/z=123$). Apesar da possível racionalização desses íons, sua baixa intensidade e a maior ocorrência de sinais sobreponíveis nessa região torna sua interpretação um pouco mais complicada e portanto, os íons destacados na porção A da figura 4.9-A são os mais úteis para a análise dos derivados.

Figura 4.9: Proposta de fragmentação do ácido caurenoico

O perfil de fragmentação dos produtos **3** a **5** compartilha algumas clivagens semelhantes ao do ácido caurenoico sililado **2** (Figura 4.11). Todos eles apresentam um pico base de

$m/z=73$, que indica a presença de um produto derivatizado, além do sinal M-15, da perda do radical metil do grupo trimetilsilil. Os produtos **3** e **4** tiveram sua estrutura proposta com base no valor do íon molecular encontrado, $m/z=390$ e $m/z=462$ respectivamente. Estes dois valores de massa correspondem ao ácido caurenico epoxidado e hidroxilado e dados de espectrometria de massas em alta resolução dos produtos não derivatizados (isômeros) confirmaram a fórmula molecular com erros inferiores a 5ppm. Portanto, os valores dos íons em alta resolução somado aos valores dos íons moleculares relativamente intensos dos derivados sililados observados nas análises de CG-EM, permitem sugerir as estruturas químicas propostas sem, no entanto, ser possível a determinação da posição da hidroxilação.

De acordo com o esquema da figura 4.9 já era esperada a eliminação de 15 do derivado epoxidado(**3**) formando o íon de $m/z=375$. A subsequente descarboxilação do íon $[M-15]^+$ originou o sinal em m/z 273, como apresentado para o ácido caurenico derivatizado (figura 4.11 estrutura **2**). Nessa mesma figura observamos que a fragmentação do produto **3** também resulta na eliminação de 43u gerando o íon de $m/z=331$ de forma análoga à proposta para o ácido caurenico Kalinovskii et al. (1971), o que estaria de acordo com a formação do epóxido na posição da insaturação.

Em relação ao produto hidroxilado a posição da hidroxilação não pode ser determinada por espectrometria de massas, especialmente devido a baixa intensidade dos sinais característicos de quebras dos anéis C e D do esqueleto caurânico, como os íons m/z 148 e $m/z=135$ do espectro de massas do ácido caurenico. Contudo, os estudos com frações microssomais, que serão apresentados a seguir e na seção 4.7 mostram que esse produto não é formado e portanto, não se justifica um maior detalhamento.

Para o produto **5** o íon $m/z=449$, que é o pico base, foi proposto como sendo resultante da clivagem do tipo beta de um dos grupamentos trimetilsilil. A proposta de fragmentação está esquematizada na figura 4.10. Este tipo de clivagem também ocorre no análogo não-derivatizado, o ácido-16,17-dihidroxicaurenico, onde o sinal $m/z=305[M-CH_3](O)]^+$ apresentou-se como o pico base nas análises de espectrometria de massas conduzidas por Hsieh et al. (2004) e Herz e Kulanthaivel (1984).

O produto **5** também foi encontrado na reação de metabolismo utilizando microssomas de ratos, demonstrando a capacidade destes catalizadores de realizar reações análogas às observadas *in vitro*. Para este produto foram adquiridos dados de espectrometria de massas com ionização por eletrospray em alta resolução e também foi realizado experimentos de espectrometria sequencial com dissociação induzida por colisão. Estes experimentos

Figura 4.10: Proposta de fragmentação do composto 5

indicaram a presença de um sinal de $m/z = 335,2215$ que corresponde a fórmula molecular do ácido di-hidroxicaurenóico desprotonado com erro de 2ppm. As análises de massas sequenciais não forneceram dados conclusivos devido a baixa fragmentação do ácido caurenóico em eletrospray, conforme exposto na seção 4.7. Os dados de espectrometria de massas indicam que a identidade deste produto formado tanto nas reações utilizando metaloporfirinas como nas reações envolvendo microsossomas de ratos pode de ser um derivado di-hidroxilado. A formação inicial do epóxido na insaturação corrobora para a localização dos dois grupamentos vicinais como será discutido posteriormente nesse trabalho.

Figura 4.11: Propostas de estruturas químicas e espectros de massas dos produtos observados após análise por CG-EM

4.5 Catálise homogênea

4.5.1 Análise da reatividade do ácido caurenoico em diferentes sistemas oxidativos: influência do tipo de catalisador e oxidante

Apesar dos diversos trabalhos que apontam atividades biológicas promissoras para o ácido caurenoico, e também para produtos fitoterápicos que o contém, ainda não são conhecidos dados do seu metabolismo tanto *in vitro* como *in vivo*. Dessa forma, o ácido caurenoico foi submetido a uma série de reações utilizando diferentes catalisadores e oxidantes que já se mostraram como catalisadores biomiméticos do CIP450, ou seja, capazes de formar os mesmos produtos observados em sistemas biológicos (MANSUY, 2007; SILVA et al., 2011; PIGATTO et al., 2011). Os catalisadores escolhidos foram as metaloporfirinas.

rinas de segunda geração: FeTDCPP, MnTDCPP, FeTFPP, MnTFPP e os catalisadores de salen *R* e *S*-Salen. Como oxidantes foram utilizados o iodosilbenzeno (PhIO), o ácido 3-cloro-peroxibenzoico(MCPBA), o ácido tercbutil-hidroperóxido(TBHP) e o peróxido de hidrogênio(H₂O₂).

Os gráficos da figura 4.12 mostram a integridade do substrato após 24 de reação. Pode-se notar que os catalisadores porfirínicos tiveram maior reatividade em relação aos catalisadores de salen, ou seja, levaram a uma maior diminuição da intensidade do sinal do substrato após a reação. Os catalisadores porfirínicos diferem pelo tipo de metal e pelo tipo de modificação na posição meso-arílica. Ambos os efeitos afetaram a reatividade do sistema de forma moderada. Os catalisadores contendo ferro como metal apresentaram maior reatividade do que os catalisadores contendo manganês. O tipo do ligante apresentou resultados divergentes em cada um dos sistemas contendo ferro ou manganês. No sistema contendo ferro o ligante 2,6-diclorofenil aumentou a reatividade em relação ao ligante pentafluorofenil, enquanto no sistema contendo manganês houve diminuição da reatividade.

O tipo de oxidante influenciou de forma mais acentuada na reatividade, sendo o oxidante iodosilbenzeno foi o que resultou nos menores valores de áreas cromatográficas do substrato. Dentre os peróxidos o peroxiácido ácido 3-cloro-peroxibenzóico foi o que mostrou a maior reatividade. Em estudos prévios o MCPBA foi empregado para epoxidações do éster metílico do ácido caurenóico, sem a presença de catalisadores, com rendimento de 78%(BATISTA et al., 2007). A maior influência do tipo de oxidante em relação ao tipo de catalisador pode indicar que a formação dos produtos observados seja via não-catalítica.

O tipo de oxidante empregado pode direcionar as reações oxidativas mediadas por metaloporfirinas e também por catalisadores de salen. De acordo com Song et al. (2006), a reação entre metaloporfirinas e o iodosilbenzeno resulta em dois principais produtos mostrados nas equações 4.1 e 4.2. Metaloporfirinas que contém grupos retiradores de elétrons nas posições meso-arílicas, como é o caso das metaloporfirinas utilizadas neste estudo, geram o cátion ferro-oxo de alta valência Fe^{IV}O⁺ (equação 4.2), que é espécie reativa na hidroxilação de alcanos e epoxidação de alcenos (VAZ; MCGINNITY; COON, 1998). Já as metaloporfirinas que contém grupos doadores de elétrons geram predominantemente a espécie Fe^{III}(Porf)⁺ – IPh⁺, não reativa. Portanto, as reações que envolvem metaloporfirinas e o PhIO como oxidante terão como única espécie reativa o cátion metal-oxo Fe^{IV}O⁺.

Figura 4.12: Influência do tipo de oxidante e catalisador na integridade do substrato após reação. Condições reacionais descritas na seção 3.4.1

A utilização de peróxidos como doadores de oxigênio pode gerar mais de uma espécie oxidante. A natureza destas espécies geradas dependerá do tipo de clivagem entre a ligação $O-O$ do peróxido. A clivagem heterolítica resulta na mesma espécie reativa gerada quando o PhIO é utilizado: a espécie $Fe^{IV+} \cdot O$. Já a clivagem homolítica da ligação $O-O$ gerará a espécie oxidante hidroxiférrica, que apresenta baixa reatividade (WOLAK; ELDIK, 2007). O tipo de clivagem dependerá do tipo de porfirina utilizada e do tipo de peróxido utilizado. Porfirinas com grupos eletronegativos tendem a formar a espécie ferroxo $Fe^{IV+} \cdot O$ e porfirinas com grupos doadores de elétrons tendem a formar a espécie hidroxiférrica. Entre os peróxidos estudados o peroxiácido ácido 3-cloro-peroxibenzoico foi o que resultou na maior reatividade do ácido caurenico; resultado este que está de acordo com os resultados obtidos por Nam et al. (2000) que apontou o mCPBA como sendo o tipo peróxido com maior capacidade de realizar clivagens heterolíticas da ligação $O-O$.

Em relação aos produtos formados, as condições experimentais que levaram a formação de sinais cromatográficos mais intensos encontram-se na tabela 4.3 e na figura 4.14. Nota-

Figura 4.13: Geração de diferentes intermediários reacionais em função do tipo da clivagem do peróxido.

se que a maior influência do tipo de oxidante na formação dos produtos. O produto epoxidado foi formado em maiores proporções nas reações que continham metaloporfirinas e o oxidante PhIO. Já os produtos mono e dihidroxilados foram formados em maior proporção nas reações que continham metaloporfirinas e MPCBA. Para todos os produtos as metaloporfirinas contendo ferro resultaram em maiores proporções de produto do que os análogos contendo manganês.

Tabela 4.3: Formação dos produtos de oxidação: influência do tipo de oxidante e catalisador

N°	Catalisador	Oxidante	Área relativa ao substrato ¹		
			AcEPOX	AcOH	AcDiOH
1	FeTDCPP	PhIO	1,24	0,15	0,05
2		MCPBA	0,04	4,5	0,18
3		H2O2	0,03	0,08	0,07
4		THBP	0,03	0,07	0,04
5	MnTDCPP	PhIO	0,06	0,56	0,24
6		MCPBA	0,66	1,67	0,09
7		H2O2	0,02	0,03	0,01
8		THBP	0,01	0,02	0,01
9	FeTFPP	PhIO	0,77	0,12	0,03
10		MCPBA	0,02	2,16	0,19
11		H2O2	0,11	0,13	0,06
12		THBP	<0,01	0,02	0,01
13	MnTFPP	PhIO	0,38	0,62	0,05
14		MCPBA	0,02	0,53	0,07
15		H2O2	0,11	0,02	0,01
16		THBP	0,02	0,07	0,03
17	<i>R,R</i> -Salen	PhIO	0,27	0,08	0,01
18		MCPBA	<0,01	0,16	0,02
19		H2O2	0,01	0,02	<0,01
20		THBP	<0,010	0,01	<0,01
21	<i>S,S</i> -Salen	PhIO	0,33	0,15	0,04
22		MCPBA	<0,01	0,14	0,02
23		H2O2	<0,01	0,02	<0,01
24		THBP	0,02	0,04	0,02

¹ Relação entre o valor da área do sinal cromatográfico do produto e do substrato (ácido caurenoico)

Figura 4.14: Formação dos produtos de oxidação: influência do tipo de oxidante e catalisador

4.5.2 Análise da reatividade do ácido caurenoico: Influência do solvente e da concentração do catalisador

Neste experimento foram avaliadas as influências do tipo de solvente no meio reacional e a concentração do catalisador. Nestes experimentos o meio reacional teve seu volume reduzido conforme descrito na seção 3.4.1. Foi avaliada a influência de três tipos de solventes na reatividade do ácido caurenoico: MeOH, ACN e DCM. Nestas reações foi utilizada uma proporção molar catalisador:oxidante:substrato de 1:60:40 com concentração do catalisador de 0,03mM sob atmosfera de ar por 24h. O catalisador FeTPP foi utilizado neste estudo afim de complementar o estudo anterior, pois trata-se de um catalisador de primeira geração, ao contrário dos outros catalisadores porfirínicos empregados, de segunda geração.

Figura 4.15: Integridade do substrato submetido a diferentes condições reacionais. Descrição na seção 3.4.1

Os resultados obtidos apontam para uma redução da reatividade do ácido caurenoico quando catalisadores de primeira geração são utilizados. Novamente o catalisador PhIO resultou em uma maior reatividade do sistema em relação ao MCPBA, no entanto esta diferença não foi muito expressiva. Em relação ao tipo de solvente, o solvente prótico MeOH foi o que resultou em menor reatividade. Os solventes apróticos DCM e ACN apresentaram reatividade semelhante, sendo que os resultados para o DCM foram muito divergentes. A influência do tipo de solvente na formação de espécies reativas pode estar relacionada com o tipo de clivagem da ligação peroxo resultante, sendo que a clivagem heterolítica é favorecida pela protonação do oxigênio terminal, causada pela presença de solventes próticos e pHs baixos (NAM et al., 2000). No entanto, Franke, Wolak e Eldik (2009) utilizando técnicas espectrofotométricas a baixas temperaturas encontraram evidências espectroscópicas da presença da espécie $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^+$ em uma faixa ampla de pHs,

utilizando MCPBA como doador de oxigênio.

O tipo de solvente empregado em reações oxidativas utilizando metaloporfirinas e catalisadores de salen é um fator de grande influência não só na reatividade, mas também na seletividade destas reações. Utilizando Mn-porfirinas Smith, Iamamoto e Vinhado (2006) demonstraram que o aumento da viscosidade dos solventes gera uma maior proporção de produtos de origem radicalar. Os autores propuseram que este aumento está relacionado com a maior difusividade dos radicais em solventes de menor viscosidade. Isso leva a uma maior migração do produtos para fora da "gaiola" de solvente, após a etapa de abstração do hidrogênio do substrato e formação do radical alquila.

4.6 Catálise heterogênea

De forma clássica, a catalise homogênea resulta em maiores rendimentos reacionais do que a catálise heterogênea, principalmente devido a maior transferência de massa entre os componentes do meio. Entretanto, para oxidações catalisadas por metaloporfirinas, a presença de um suporte inorgânico pode reduzir a oxidação do catalisador, o que pode levar a maiores rendimentos. Para a oxidação de alcanos cíclicos como o cicloocteno e também para fármacos como a isoniazida, Faria (2010) obteve rendimentos maiores utilizando catalisadores suportados. Para este estudo foi utilizada a metaloporfirina FeTFPP imobilizada em matrizes de sílica modificada com aminopropil (APS) e 1,6-Diaminohexil(DaHS). Também foi utilizada a metaloporfirina FeTMPyP/mont imobilizada na argila montmorilonita K10. Como oxidante foi utilizado o MCPBA, que apresentou a maior reatividade nos experimentos de catálise homogênea. Foi utilizada a proporção catalisador:oxidante:substrato de 1:40:40.

Após a 24h de reação os meios foram filtrados, secos e derivatizados. A análise por GC-EM das reações inesperadamente, não mostrou sinal algum, nem mesmo o sinal referente ao substrato. Inicialmente pensou-se em algum aspecto relativo à metodologia analítica como a concentração do derivatizante, ou mesmo um erro do instrumento. Estas possibilidades foram avaliadas, sem êxito. Então, a reação foi repetida e o produto reacional seco, foi submetido a uma extração com MeOH. O extrato metanólico foi seco, derivatizado e analisado nas mesmas condições. A figura 4.16 mostra ambos cromatogramas, com e sem extração. Nota-se que os sinais relativos ao ácido caurenóico foram identificados, bem como de todos os produtos já encontrados nas reações em meio homogêneo. Uma possível explicação para este fato reside na composição dos suportes inorgânicos, que por

serem compostos de silicatos, podem ter adsorvido os derivados ácidos.

Figura 4.16: Cromatograma representativo de reação de oxidação do ácido caurenóico utilizando catalisador FeTFPP suportado em 1,6-Diaminohexil sílica. **A-** meio analisado sem extração. **B-** meio extraído com MeOH e analisado.

O procedimento de análise foi modificado e os demais meios foram analisados. A figura 4.17 apresenta os valores das áreas cromatográficas dos sinais do substrato e dos três produtos de oxidação. Os resultados mostram que os catalisadores imobilizados apresentaram reatividade muito superior à catalise homogênea. Especialmente para o catalisador FeTFPP-APS, não foi possível detectar sinais relativos ao substrato, indicando que ele pode ter sido consumido totalmente nesta reação. Este catalisador foi o que produziu a maior relação produto/substrato para o produto **5** igual a 1,89. O catalisador FeTFPP-DaHS foi o que apresentou a menor reatividade, no entanto, resultou no maior valor de área para o sinal correspondente ao produto epoxidado. O catalisador FeTMPyP, o único catalisador com grupos ionizados nas posições meso-arílicas, foi o produto que apresentou a maior seletividade, formando predominantemente o produto epoxidado.

Figura 4.17: Formação dos produtos de oxidação do ácido caurenoico após catálise heterogênea

4.7 Catálise utilizando microssomas hepáticos

Para estabelecermos uma correlação entre os produtos formados nas reações oxidativas utilizando metaloporfirinas e as reações de biotransformação mediadas pelo CYP450, o ácido caurenoico foi incubado com microssomas hepáticos isolados de fígados de ratos. Nestas reações foram utilizados dois controles: um não continha o substrato e o outro não continha os cofatores responsáveis por doar elétrons ao ciclo catalítico do CYP450. Após 4h de reação, a incubação foi interrompida adicionando AcOEt nos meios reacionais. A fração AcOEt foi recolhida e extratos foram secos e analisados por CG-EM. O cromatograma desta análise é mostrado na figura 4.18.

A comparação do tempo de retenção em CG-EM do perfil de fragmentação do produto obtido e dos produtos já gerados nas reações utilizando metaloporfirinas indica que se trata de um mesmo produto, o derivado dihidroxilado **5**. Os espectros de massas destes produtos são apresentados na figura 4.19. A presença de um íon de massa ímpar como sendo o de massa mais elevada do espectro, indica este íon pode ser resultante da fragmentação do íon molecular. Para confirmarmos esta hipótese, os meios reacionais da reação de biotransformação foram analisados utilizando espectrometria de massas com ionização por *electrospray* em modo negativo de ionização acoplado a um cromatógrafo de ultra-eficiência. Novamente foi analisado o meio controle, sem cofatores, e a reação. O cromatograma

Figura 4.18: Formação dos produtos de oxidação do ácido caurenóico utilizando microsomas hepáticos

obtido encontra-se na figura 4.20 abaixo.

Utilizando a cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada ao detector de espectrometria de massas, foi observado somente um produto no cromatograma com tempo de retenção de 1,70min. Outros sinais como os de tempo de retenção iguais a 0,46min, 2,51min, 5,54min e 5,91min tiveram sinais correspondentes na análise do branco. O espectro de massas do produto é mostrado na figura 4.21. Este espectro apresenta poucos sinais sendo os dois mais intensos os íons de m/z 335 e 671, sendo o último o aduto $[2M-1]^-$. O sinal de m/z 693 não é o aduto do íon m/z 371 e a identidade destes dois sinais não pôde ser determinada. Nessa situação, o íon 335 foi selecionado para estudos de espectrometria de massas sequencial com dissociação induzida por colisão, utilizando argônio como gás de colisão. A figura 4.22 mostra o estudo de dissociação induzida por colisão utilizando energias entre 20-40V.

Os resultados apresentados para o perfil de fragmentação utilizando ionização por *electrospray* vão ao encontro dos resultados já obtidos para o ácido caurenóico (GASPARETTO et al., 2011). São formados poucos íons em energias mais baixas, geralmente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, enquanto em energias mais altas ocorre a decomposição do analito, resultado em espectros não reproduzíveis. Portanto, a escolha da técnica de CG-EM com ionização por elétrons, se mostrou uma técnica complementar à UPLC-MS/MS para o estudo dos produtos de oxidação do ácido caurenóico.

Para a determinação da massa molecular do íon $m/z=335$ foi adquirido o espectro

Figura 4.19: Comparação dos espectros de massas dos produtos obtidos através de reações utilizando microsomas hepáticos e catalisadores metaloporfirínicos

de massas em alta resolução. O valor experimental encontrado para o $[M-H]^-$ foi de m/z 335,2215 o que corresponde a um erro de 2ppm para a fórmula molecular $C_{20}H_{31}O_4$. Os resultados apresentados acima, e a proposta de fragmentação discutida na seção 4.4 sugerem que os catalisadores porfirínicos são modelos capazes de produzir o mesmo tipo de metabólito observado em sistemas biológicos. Sugere-se ainda que se trata do derivado di-hidroxilado nas posições 16 e 17 do ácido caurenico.

Uma proposta para a formação do produto di-hidroxilado envolve a epoxidação da dupla exocíclica com a posterior abertura do epóxido, resultado no produto diol. A formação de derivados di-hidroxilados em qualquer outra posição do esqueleto caurânico, geraria um produto de fórmula molecular igual a $C_{20}H_{30}O_4$; duas unidades de massa a menos do que o produto observado experimentalmente ($C_{20}H_{32}O_4$). Como a formação de epóxidos pode ser facilmente excluída através da análise do valor da massa molecular dos produtos sililados, as únicas posições para a formação dos di-hidroxos são os carbonos 16 e 17. Portanto, existem fortes evidências que apontam para a identidade do produto de oxidação em microsomas hepáticos de ratos ser o ácido 16,17-dihidroxi-caurenico.

Figura 4.20: Análise por UPLC-MS do produto reacional obtido utilizando microssomas hepáticos de ratos

Figura 4.21: Espectro de massas do produto reacional obtido utilizando microssomas hepáticos de ratos com ionização por eletrospray

Figura 4.22: Espectros de MS/MS gerados através da dissociação induzida por colisão do íon de $m/z=335$. Energias de colisão variando de 20 a 40V

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliadas as condições reacionais que resultaram na maior formação de produtos de oxidação em meios homogêneos e heterogêneos. Os resultados, embora algumas vezes conflitantes com dados da literatura, refletem a complexidade das reações mediadas pelo citocromo P 450. A química destas reações envolve uma aparente contradição: por um lado realizam reações com alta especificidade, como é o caso da síntese de prostaglandinas e outros hormônios e por outro, catalisam a oxidação de uma infinidade de xenobióticos absorvidos pelos organismos vivos. Desde sua descoberta, há mais de 50 anos, a química das reações do CIP450 vêm sendo desvendada e ainda restam diversas lacunas no seu entendimento.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a formação de produtos de metabolismo do ácido caurenico *in vitro* utilizando microsomas de ratos apresenta alta seletividade, com a formação de um único produto: o ácido-15-17-dihidroxicaurenico. Nas reações catalisadas por metaloporfirinas e catalisadores de salen foram observados mais dois produtos: um hidroxilado e outro epoxidado. Uma proposta para a formação *in vivo* do produto di-hidroxilado pode ser a geração do epóxido e a sua abertura, uma vez que o produto epoxidado foi o formado em maior proporção em relação aos demais. A catalise heterogênia utilizando metaloporfirinas imobilizadas em sílicas modificadas e na argila montmorilonita K10 mostrou-se uma boa alternativa para estudos de metabolismo: O substrato foi consumido totalmente no sistema FeTFPP/APS e este sistema resultou na maior formação do derivado di-hidroxilado, enquanto no sistema FeTMPyP/mont as reações foram seletivas para o produto mono-hidroxilado.

O estudo de produtos de oxidação utilizando catalisadores biomiméticos é uma área que têm urgência por novos trabalhos. Dia após dia, novos produtos fitoterápicos entram no mercado, e nem sempre os produtos de metabolismo são menos tóxicos do que seus precursores. No entanto, alguns pontos-chave merecem destaque durante a condução destes estudos. A escolha da matriz para o isolamento dos compostos estudados, por exemplo, é um dos fatores mais importantes dos trabalhos. Apesar de algumas substâncias serem

amplamente conhecidas, e consumidas ainda não existem fontes comerciais dos marcadores fitoquímicos da espécie. A escolha de uma matriz muito complexa, ou mesmo de difícil acesso para coleta, pode atrasar o desenvolvimento de um novo produto. Por fim, a evolução do entendimento da química das metaloporfirinas poderá gerar catalisadores cada vez mais reativos, e paralelamente seletivos para alguns produtos ou reações.

APÊNDICE A – ALGORÍTIMO UTILIZADO PARA A IMPORTAÇÃO DOS DADOS

```
#No CG solution: Bath Processing> Settings> deixar marcado: qualitative
peak table,
output ascII, output per analysis, Auto-increment e Delimiter Comma
#O primeiro arquivo deverá se chamar Amostra01 e o increment
mantido ligado
#Importar dos dados
files<- (Sys.glob(path="SUA PASTA ONDE ESTÃO OS ARQUIVOS
GERADOS NO GCSOLUTION"*.txt"))
#gera a lista de arquivos a serem processados
listadearquivos<- lapply(files, function(x)read.csv(x,skip=8,header=T,as.is=T))
#Cria os dados do substrato.
Area.Ac <- list()
for(i in 1:length(listadearquivos)){
  k= sum(abs(listadearquivos[[i]][,2]-17.00)<0.07)
  w <- which.min(abs(listadearquivos[[i]][,2]-17.00))
#se for encontrado algum valor na lista de tempos de
retenção que for menor que 0.07 em relação ao tempo
referência (17.00) ele ira retornar 1 se nao 0
if (k>0)
#aqui se forem encontrados mais de um valor, ele
importará o tempo de retenção mais próximo utilizando
a função w which.min
Area.Ac[[i]]=listadearquivos[[i]][w,6] else
  Area.Ac[[i]]=NA}
#limpa
Area.Ac <- unlist(Area.Ac)
```

```
rm(k,w)
#Começa para outra substância
AcEPOX1 <- list()
for(i in 1:length(listadearquivos)){
  k<- sum(abs(listadearquivos[[i]][,2]-19.155)<0.07)
  w<- which.min(abs(listadearquivos[[i]][,2]-19.155))
  if (k>0)
    AcEPOX1[[i]]=listadearquivos[[i]][w,6] else
    AcEPOX1[[i]]=NA
}
AcEPOX1 <- unlist(AcEPOX1)
rm(k,w)
Ac_OH <- list()
for(i in 1:length(listadearquivos)){
  k<- sum(abs(listadearquivos[[i]][,2]-19.740)<0.07)
  w<- which.min(abs(listadearquivos[[i]][,2]-19.740))
  if (k>0)
    Ac_OH[[i]]=listadearquivos[[i]][w,6] else
    Ac_OH[[i]]=NA}
Ac_OH <- unlist(Ac_OH)
rm(k,w)
#Para outra:
Ac_BIO <- list()
for(i in 1:length(listadearquivos)){
  k<- sum(abs(listadearquivos[[i]][,2]-21.455)<0.07)
  w<- which.min(abs(listadearquivos[[i]][,2]-21.455))
  if (k>0)
    Ac_BIO[[i]]=listadearquivos[[i]][w,6] else
    Ac_BIO[[i]]=NA}
Ac_BIO <- unlist(Ac_BIO)
rm(k,w)
```

ANEXO A – ESPECTROS DE ^1H -RMN DOS PRODUTOS ISOLADOS À PARTIR DE *COPAIFERA SSP*

ANEXO B – ESPECTROS DE ^{13}C -RMN E DEPT-135 DOS PRODUTOS ISOLADOS À PARTIR DE *COPAIFERA SSP*

ANEXO C – ESPECTROS DE ^1H -RMN DO PRODUTO ISOLADOS À PARTIR DE *WEDELIA PALUDOSA*

ANEXO D – ESPECTROS DE ^{13}C -RMN E DEPT-135 DO PRODUTO ISOLADOS À PARTIR DE *WEDELIA PALUDOSA*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. M. A. et al. Atividade leishmanicida de lactonas sesquiterpênicas de *tithonia diversifolia* (asteraceae). In: **30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindoia -SP: [s.n.], 2007. v. 61, n. 01, p. 85,87.
- BAILLIE, T. A. et al. Drug metabolites in safety testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 3, p. 188–196, 2002.
- BARROS, V. P. de. **Uso de metaloporfirinas como modelos do citocromo P450 no metabolismo de corantes azo**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo-Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2008.
- BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by hplc of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* d.c. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 119–125, 2005.
- BATISTA, R. et al. New oxidized ent-kaurane and ent-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 3, p. 622–627, 2007.
- BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 346, n. 2-3, p. 171–184, 2004.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Development and validation of an rp-hplc method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Med**, v. 75, p. 280–285, 2009.
- BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 230–235, 2006.
- BRESCIANI, L.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. Comparative study of different parts of *wedelia paludosa* by gas chromatography. **Nat Prod Lett**, v. 14, p. 247–254, 2000.
- CARVALHO, G. J. A. de et al. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, p. 24–26, 2001. ISSN 0100-4042.
- COLEMAN, M. **Human Drug Metabolism: An Introduction**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.
- COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2821–2826, 2004.

DENISOV, I. G. et al. Structure and chemistry of cytochrome p450. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2253–2278, 2005.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH Topic M3 (R2) Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals**. 2009. Disponível em: <<http://www.ich.org>>.

FARIA, A. L. d. **Complexos de salen e metaloporfirínicos como catalisadores na oxidação de hidrocarbonetos e fármacos em meio homogêneo e heterogêneo**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2010.

FDA, C. **Guidance for Industry - Safety Testing of Drug Metabolites**. 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/FDA-2008-D-0065-GDL.pdf>>.

FERRARI, M. et al. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 905–907, 1971.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

FRANKE, A.; WOLAK, M.; ELDIK, R. van. Factors that affect the nature of the final oxidation products in ?peroxo-shunt? reactions of iron-porphyrin complexes. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, p. 10182 – 10198, 2009.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1802–1811, 2004.

GARCÍA, P. A.; OLIVEIRA, A. B. de; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, p. 455–483, 2007.

GASPARETTO, J. a. C. et al. *Mikania glomerata* spreng. e *M. laevigata* sch. bip. ex baker, asteraceae: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 627–640, 2010.

GASPARETTO, J. a. C. et al. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 740–748, 2011.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol.Chem.**, v. 177, p. 751, 1949.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E.; MYERS, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. oxygen transfer from iodosylbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 4, p. 1032–1033, 1979.

HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P. *ent*-pimaranes, *ent*-kauranes, heliangolides and other constituents of three *Helianthus* species. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1453–1459, 1984.

HSIEH, T.-J. et al. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 51, p. 869–876, 2004.

IOANNIDES, C. (Ed.). **Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics**. [S.l.]: RSC Pub., 2008. (Issues in Toxicology).

JIN, S.; BRYSON, T. A.; DAWSON, J. H. Hydroperoxoferric heme intermediate as a second electrophilic oxidant in cytochrome p450-catalyzed reactions. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 644–653, 2004.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. O gênero copaifera l. **Química Nova**, v. 25, p. 273–286, 2002.

KALINOVSKII, A. I. et al. Mass spectrometry study of kaurene derivatives iii. (-)-kaurene and methyl esters of kaurenoic acids. **Organic Mass Spectrometry**, v. 3, p. 269–273, 1971.

KIM, Y. H.; CHUNG, B. S.; SANKAWA, U. Pimaradiene diterpenes from *acanthopanax koreanum*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 6, p. 1080–1083, 1988.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 79–96, 2008.

LUCAS, H. J.; KENNEDY, E. R.; FORMO, M. W. Iodosobenzene. **Org. Synth. Coll.**, v. 3, p. 483, 1955.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome p450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, Elsevier, v. 10, n. 4, p. 392–413, 2007.

MARQUINA, S. et al. Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2017–2022, 2009.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the no-cyclic gmp-protein kinase g-atp-sensitive potassium channel signaling pathway. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 896–904, 2012.

MOBOT-Missouri Botanical Garden. *Sphagneticola trilobata* in: **Tropicos.org**. 2013. Disponível em: <<<http://www.tropicos.org>>>.

MONDIN, C.; JR., J. B. *Sphagneticola* in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB016304>>.

NAM, W. et al. New insights into the mechanisms of o-o bond cleavage of hydrogen peroxide and tert-alkyl hydroperoxides by iron(iii) porphyrin complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 8677–8684, 2000.

NIEHUES, M. et al. Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase i metabolism of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 804–812, 2012.

- OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E. G.; BASTOS, D. Z. L. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *annona glabra* by hplc. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 6, p. 368–371, 2002.
- PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 2002.
- PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. **Handbook of Drug Metabolism**. [S.l.]: Informa Healthcare USA, 2008. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences).
- PECHWANG, J. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *psilocybe cubensis*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 10, p. 905–914, 2010.
- PIGATTO, M. C. et al. Metabolism evaluation of the anticancer candidate ac04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4245 – 4251, 2011.
- R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2011. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.
- REEDIJK, J.; BOUWMAN, E. **Bioinorganic Catalysis**. [S.l.]: Marcel Dekker, Incorporated, 1999.
- ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The World Medicines Situation 2011. Tradicional medicines: Global situations, issues and challenges**. 2011.
- SALTZMAN, H.; SHAREFKIN, J. G. Iodosobenzene. **Org. Synth. Coll.**, v. 5, p. 658, 1963.
- SANTOS, M. D. d. ***Lychnoflora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo de substâncias bioativas**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.
- SANTOS, m. d. d.; IAMAMOTO, y.; LOPES, N. P. Hplc-esi-ms/ms analysis of oxidizes di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalydes reactions. **Química Nova**, v. 31, p. 767–770, 2008.
- SCHAAB, E. H. et al. Biomimetic oxidation of piperine and pipartine catalyzed by iron(iii) and manganese(iii) porphyrins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 912–916, 2010.
- SILVA, D. C. d. et al. Carbamazepine oxidation catalyzed by manganese porphyrins: Effects of the β -bromination of the macrocycle and the choice of oxidant. **Applied Catalysis A: General**, v. 408, p. 25 – 30, 2011.
- SILVA, E. A. et al. The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 397–400, 1999.

- SMITH, J. R.; IAMAMOTO, Y.; VINHADO, F. S. Oxidation of alkanes by iodosylbenzene(phio) catalysed by supported mn(iii) porphyrins: Activity and mechanism. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, p. 23–30, 2006.
- SONG, W. J. et al. Mechanistic insights into the reversible formation of iodosylarene-iron porphyrin complexes in the reactions of oxoiron(iv) porphyrin π -cation radicals and iodoarenes: Equilibrium, epoxidizing intermediate, and oxygen exchange. **Chemistry - A European Journal**, WILEY-VCH Verlag, v. 12, n. 1, p. 130–137, 2006.
- TAVEEPANICH, S. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *absidia blakesleeana* and *rhizopus oligosporus*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 11, p. 1050–1058, 2010.
- TINCUSI, B. M. et al. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, p. 808–812, 2002.
- VAZ, A. D. N.; MCGINNITY, D. F.; COON, M. J. Epoxidation of olefins by cytochrome p450: Evidence from site-specific mutagenesis for hydropedoxo-iron as an electrophilic oxidant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3555–3560, 1998.
- VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituents from aerial parts of *Wedelia paludosa*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 854 – 856, 2001. ISSN 0367-326X.
- VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E. de; LANÇAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ("guaco") leaves by capillary gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 74–77, 1997.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. 2. ed. [S.l.]: Springer, 1996.
- WATSON, J.; SPARKMAN, O. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation**. 4ed. ed. [S.l.]: Wiley, 2008. ISBN 9780470516881.
- WOLAK, M.; ELDIK, R. v. Mechanistic studies on peroxide activation by a water-soluble iron(iii)porphyrin: Implications for o-o bond activation in aqueous and nonaqueous solvents. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, p. 4873–4883, 2007.