UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de
Copaifera langsdorffii

Ricardo Andrade Furtado

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii*

Tese de Doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Ricardo Andrade Furtado

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Versão corrigida de Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 04/04/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Furtado, Ricardo Andrade

Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii*. Ribeirão Preto, 2013.

171p.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Copaifera langsdorffii*, 2. biotransformação, 3. atividades analgésica e anti-inflamatória

Folha de aprovação

Nome do aluno: Ricardo Andrade Furtado

Título de trabalho: Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii*

Tese de Doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em: 04/04/2013

Banca examinadora

Prof. Dr.	Jairo Kenupp Bastos	
Instituição:	FCFRP-USP	Assinatura:
Prof. Dr.	Jose Mauricio Spin	
Instituição:	IBB-UNESP	Assinatura:
Prof. Dr.	Ademir Alves da Silva Filho	
Instituição:	FF-UFJF	Assinatura:
Prof. Dr.	Chiango Mattar Cunha	
Instituição:	FMRP	Assinatura:
Prof. Dr.	NIEGE ARAÇARI JACOMETTI CARLOS FURTADO	
Instituição:	FCFRP-USP	Assinatura:

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente, aos meus pais Lauro Alves Furtado e Adriana Vilela Andrade Furtado, a minha irmã Michelle Andrade Furtado e minha namorada Laura Nascimento Silva por sempre me apoiarem e auxiliarem em todas as etapas de minha vida.

Aos meus queridos(as) amigos(as), que perto ou distante sempre torceram pela minha felicidade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela orientação e oportunidade.

Aos professores do laboratório de farmacognosia, Dr. Fernando Batista da Costa e Dr^a Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado, por sempre auxiliarem meu crescimento.

Aos técnicos do nosso laboratório, Maria Angélica, Valtinho e Mário.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia: Cris, Taty, Eli, João Paulo, July, Juzinha, Mariza, Rejane, Wanessa, Willian, as Danis, Bruno, Tiago e João Luis por toda troca de conhecimento e companheirismo e, de uma forma especial ao amigo Mauro que me ensinou muito e contribuiu incondicionalmente para a realização deste trabalho.

A minhas amigas Jacqueline e Carla pela amizade e pela parceria desde a graduação.

Ao Reinaldo e Ramon, do biotério, pela paciência e auxílio com meus animais.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, pela identificação botânica da espécie trabalhada.

A todos meus familiares Lauro, Adriana, Michelle e Laura por todas as orações e apoio.

À Coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leslie Gunatilaka por me receber e orientar em seu laboratório durante o doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Kamal Gunaherath e sua esposa Hemantha por me auxiliarem e terem se tornados grandes amigos durante meu doutorado sanduíche.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Resumo

Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii*. Ribeirão Preto, 2013. 171p Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Copaifera langsdorffii Desf. é conhecida popularmente como “copaíba”, sendo encontrada nas regiões norte e nordeste do Brasil. Nesta tese reportam-se o estudo fitoquímico das folhas de *C. langsdorffii*, por meio do fracionamento de seu extrato hidroalcoólico, o isolamento e a purificação de seus metabólitos secundários majoritários, a biotransformação do epóxido do ácido caurenóico, bem como a avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato e compostos isolados. Para avaliação do perfil cromatográfico, o extrato hidroalcoólico das folhas (Cop) foi particionado em hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e água. Com o uso de filtração em gel, Cromatografia Contra Corrente e CLAE preparativa foram isolados os compostos quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina), canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina), bem como os ácidos 4',4''-dimetóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico e 4-(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico. O ácido caurenóico e o caurenol foram isolados em coluna de gel de sílica a partir da fração em acetato de etila. O ácido caurenóico foi submetido a epoxidação com ácido 3-cloroperbenzóico e foi submetido à biotransformação pelo fungo *Beauveria sulfurens* em meio sintético. A biotransformação do epóxido do ácido caurenóico forneceu o ácido 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico, até então desconhecido, bem como o ácido 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico, o ácido 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico, o ácido 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico e o ácido 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico. Cop e caurenol reduziram a inflamação induzida por ácido acético com máxima inibição de 40,3 e 53,6%, respectivamente. Na segunda fase do ensaio de formalina foi observada redução de 54,5 e 64,6%, respectivamente. A resposta inflamatória observada por carragenina e dextrana mostrou máxima redução de 52,3 e 43,6% para Cop e de 64,3 e 80% para caurenol, respectivamente. Cop e caurenol reduziram a produção de NO estimulada por LPS e aumentaram a liberação de TNF- α , mas não modularam a expressão de IL-6 e IL-10. Portanto, caurenol está envolvido na atividade antiedematogênica do extrato. Já a quercitrina e a afzelina não foram ativas nos protocolos utilizados. Cop e caurenol não alteraram a primeira fase do ensaio de formalina, a latência em placa quente, o desempenho motor dos animais e a migração celular. Concluiu-se que Cop e caurenol possuem atividade antiedematogênica atuando em sítios periféricos, contudo essa propriedade não está associada com a regulação da migração celular, TNF- α , IL-6 e IL-10.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, biotransformação, atividades analgésica e anti-inflamatória

Abstract

Phytochemical study, analgesic and anti-inflammatory evaluation and biotransformation of a compound isolated from the leaves of *Copaifera langsdorffii*. 2013. 171p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Copaifera langsdorffii Desf., known as "copaiba", is found in the northern and northeastern of Brazil. This thesis reports the phytochemical study of *C. langsdorffii* leaves, through its hydroalcoholic extract (Cop) fractionation, isolation and purification of its major secondary metabolites, the biotransformation of kaurenoic acid epoxide, as well the evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activities of the extract and isolated compounds. For the evaluation of the chromatographic profile, the extract was partitioned into hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and water fractions. With the use of gel filtration chromatography, counter current chromatography and preparative HPLC, quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (quercitrin), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (afzelin), 4'-4"-dimethoxy-4,5-di-*O*-galloylquinic acid and 4-(4-methoxy galloyl)-3,5-di-*O*-galloylquinic were isolated. The epoxidation of kaurenoic acid was performed with 3-chloroperbenzoic acid and it was submitted to biotransformation by the fungus *Beauveria sulfurens* in synthetic medium. Biotransformation of kaurenoic acid epoxide furnished the unknown compound 7 β ,17-dihydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid and the compounds 7 α ,17-dihydroxy-16 α -*ent*-kauran-19-oic acid, 7 β ,17-dihydroxy-16 α -*ent*-kauran-19-oic acid, 9 β , 16 α ,17-trihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid and 16 α ,17-dihydroxy-19-*ent*-kauran-oic acid. Cop and kaurenol reduced the inflammation induced by acetic acid in mice with a maximal inhibition of 40.3 and 53.6%, respectively. The second phase in the formalin test in mice showed maximal reduction of 54.5 and 64.6%, respectively. The inflammatory responses induced by both carrageenan and dextran in rats showed maximal reduction of 52.3 and 43.6 % for Cop, as well as 64.3% and 80.0% for kaurenol, respectively. Cop and kaurenol reduced the NO production stimulated by LPS in a dose-dependent manner, and increased the release of TNF- α , but did not regulate IL-6 and IL-10. Therefore, kaurenol is involved in the extract antiedematogenic activity of the extract, whereas quercitrin and afzelin were not active in the used protocols. Cop and kaurenol did not alter the formalin first phase, hot-plate latency, motor performance or cell migration. The obtained results show that *C. langsdorffii* extract and kaurenol possess antiedematogenic properties acting on peripheral sites, but these properties are not associated with cell migration, TNF- α , IL-6 or IL-10 regulation.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, biotransformation, analgesic and anti-inflammatory activities

Lista de abreviações

Cop	Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>
Quercitrina	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-raminopiranosídeo
Afzelina	Canferol-3- <i>O</i> - α -L-raminopiranosídeo
DAGQ	Derivados do ácido galoilquínico
MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
DMSO	Dimetilsulfoxido
PBS	Tampão fosfato
LPS	Lipopolissacarídeo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
MTT	Ensaio colorimétrico utilizando o ácido 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de ^1H
HMBC	Heteronuclear multiple Bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence correlation
HRESIMS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
COSY	Correlation spectroscopy
NOE	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NOEDIFF	Nuclear overhauser effect difference spectroscopy
δ	Deslocamento químico (em partes por milhão)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Múltiplo
s	Singlete
d	Dúlete
dd	Duplo dúlete
t	Triplete
CCD	Cromatografia de camada delgada

CCC	Cromatografia contra corrente
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
PREP	Preparativo
DAD	Detector com arranjo de diodos
UV	Ultravioleta
<i>tr</i>	Tempo de retenção
<i>R_f</i>	Índice de retenção
K	Coeficiente de partição
p.c.	Peso corpóreo
i.p.	Intraperitoneal
rpm	Rotação por minuto
D.P.	Desvio padrão
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

Lista de Figuras

- Figura 1** A: *Copaifera langsdorffii*; B: Folhas e sementes de *C. langsdorffii*.
- Figura 2** Folhas de *Copaifera langsdorffii* em estufa de ar circulante para secagem; B: folhas secas; C: folhas trituradas
- Figura 3** Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*
- Figura 4** Cromatografo de contracorrente de alta velocidade (CCC)
- Figura 5** Fracionamento de fração aquometanólica em coluna preenchida com gel de sephadex
- Figura 6** Etapas do processo de biotransformação: Do cultivo do fungo a extração
- Figura 7** Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD do extrato hidroalcoólico de *C. Langsdorffii* e das frações em CH₂Cl₂, em AcOEt e fração aquometanólica
- Figura 8** Cromatogramas das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior) usados para calculo do coeficiente de partição
- Figura 9** Análise em CCD das frações coletadas em CCC
- Figura 10** Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD dos compostos purificados **1** (*tr*: 15,6 min.) e **2** (*tr*: 17,9 min.) e seus respectivos espectros em UV
- Figura 11** Estruturas químicas dos compostos 1 e 2
- Figura 12** Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD dos compostos **3** e **4** e seus respectivos espectros de UV
- Figura 13** Estrutura química dos compostos **3** e **4**
- Figura 14** Correlações de HMBC e COSY mostradas para o composto **3**
- Figura 15** Correlações de HMBC e COSY mostradas para o composto **4**
- Figura 16** Estrutura molecular dos compostos **5** e **6**
- Figura 17** Frações e compostos obtidos do processo de biotransformação
- Figura 18** Estrutura molecular dos compostos **7** ao **12**
- Figura 19** Correlações de HMBC e NOE mostradas para o composto **8**
- Figura 20** Correlações de NOE mostradas para o composto **9**
- Figura 21** Correlações deHMBC, COSY e NOE mostradas para os compostos **10** e **11**
- Figura 22** Correlação de HMBC mostrada para o composto **12**
- Figura 23** Número médio e desvio padrão de cruzamentos entre as áreas determinadas pelo ensaio de “campo-aberto” em 6 min.

- Figura 24** Efeito das diferentes doses do extrato de *C. langsdorffii* frações e compostos isolados sobre o número de contorções abdominais
- Figura 25** Tempo de lâmbida de pata induzida por formalina em camundongos tratados com Cop e caurenol
- Figura 26** Efeito das diferentes doses de *C. langsdorffii* e caurenol sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina
- Figura 27** Efeito das diferentes doses de *C. langsdorffii* e caurenol sobre o volume do edema de pata induzido por dextrana
- Figura 28** Número de células obtidos da lavagem peritoneal de camundongos
- Figura 29** Avaliação do transito intestinal com carvão ativo em camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii* e caurenol
- Figura 30** Viabilidade celular em relação ao grupo controle (Ctr) obtida pelo ensaio de MTT de Cop e caurenol
- Figura 31** Efeito do extrato de *C. langsdorffii* e caurenol na produção de NO na ausência e presença de LPS
- Figura 32** Efeito do extrato de *C. langsdorffii* e caurenol na modulação de TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-6 (C)
- Figura 33** Espectro de RMN de ^1H do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆; 500 MHz
- Figura 34** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆; 500 MHz
- Figura 35** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆; 125 MHz
- Figura 36** Correlações de HMQC do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆
- Figura 37** Correlações de HMBC do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆
- Figura 38** Espectro de RMN de ^1H do composto 2: canferol-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆; 500 MHz
- Figura 39** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 2: canferol-3-*O*- α -L-

raminopiranosídeo em DMSO-*d*6; 500 MHz

Figura 40 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*6; 125 MHz

Figura 41 Correlações de HMQC do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*6

Figura 42 Correlações de HMQC do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*6

Figura 43 Espectro de RMN de ^1H do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6; 500 MHz

Figura 44 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6; 500 MHz

Figura 45 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6; 125 MHz

Figura 46 Correlações de HMQC do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 47 Correlações de HMBC do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 48 Correlações de COSY do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 49 Espectro de RMN de ^1H do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6; 500 MHz

Figura 50 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6; 125 MHz

Figura 51 Correlações de HMQC do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 52 Correlações de HMBC do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 53 Correlações de COSY do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 54 Espectro de RMN de ^1H do composto 5: ácido caurenóico em clorofórmio-*d*; 500

MHz

- Figura 55** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 5: ácido caurenóico em clorofórmio-*d*; 500 MHz
- Figura 56** Espectro de RMN de ^1H do composto 6: caurenol em clorofórmio-*d*; 500 MHz
- Figura 57** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 6: caurenol em clorofórmio-*d*; 500 MHz
- Figura 58** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6: caurenol em clorofórmio-*d*; 125 MHz
- Figura 59** Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6: caurenol em clorofórmio-*d*; 125 MHz
- Figura 60** Espectro de RMN de ^1H do composto 7: epoxido do ácido caurenóico em clorofórmio-*d*; 400 MHz
- Figura 61** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 7: epoxido do ácido caurenóico em clorofórmio-*d*; 400 MHz
- Figura 62** Espectro de RMN de ^1H do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina; 400 MHz
- Figura 63** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina; 400 MHz
- Figura 64** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina; 100 MHz
- Figura 65** Correlações de HSQC do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina
- Figura 66** Correlações de HMBC do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina
- Figura 67** Ampliação das correlações de HMBC do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina
- Figura 68** Espectro de RMN de ^1H do composto 9: metil 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz
- Figura 69** Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 9: metil 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz
- Figura 70** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9: metil 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-

oico em clorofórmio-*d*; 100 MHz

Figura 71 Espectro de RMN de ^1H do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

Figura 72 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

Figura 73 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 100 MHz

Figura 74 Correlações de HSQC do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 75 Correlações de HMBC do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 76 Correlações de COSY do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 77 Espectro de RMN de ^1H do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

Figura 78 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

Figura 79 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*; 100 MHz

Figura 80 Correlações de HSQC do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 81 Correlações de HMBC do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 82 Ampliação das correlações de HMBC do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 83 Correlações de COSY do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico em clorofórmio-*d*

Figura 84 Espectro de RMN de ^1H do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

Figura 85 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-

cauran-19-óico em clorofórmio-*d*; 400 MHz

- Figura 86** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*; 100 MHz
- Figura 87** Correlações de HSQC do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*
- Figura 88** Correlações de HMBC do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*
- Figura 89** Ampliação das correlações de HMBC do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*
- Figura 90** Correlações de COSY do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*
- Figura 91** Correlações de COSY do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em clorofórmio-*d*

Lista de Esquemas

Esquema 1   Mecanismo de obtenção do composto 6

Esquema 2   Mecanismo de obtenção do composto 7

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos 1 e 2 obtidos em DMSO-*d*₆ e dados da literatura
- Tabela 2** Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel
- Tabela 3** Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto 3 (ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico) em DMSO-*d*₆ e dados da literatura
- Tabela 4** Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto 4, ácido 4-(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*₆ e dados da literatura
- Tabela 5** Dados dos espectros de RMN obtidos para os compostos 5 e 6 e dados da literatura
- Tabela 6** Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 8 em C₅D₅N
- Tabela 7** Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 9, 10, 10, e 12 em CDCl₃
- Tabela 8** Número médio e desvio padrão de contorções abdominais e peso de camundongos tratados com diferentes doses do extrato de *C. langsdorffii* e suas frações
- Tabela 9** Tempo de latência e peso de camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii*
- Tabela 10** Número médio e desvio padrão do tempo de lambida de pata de camundongos tratados com solução de formalina a 0,6%
- Tabela 11** Número médio e desvio padrão do volume do edema de pata induzido por carragenina de ratos tratados com as diferentes doses do extrato das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii* e caurenol
- Tabela 12** Número médio e desvio padrão do volume do edema de pata induzido por dextrana de ratos tratados com as diferentes doses do extrato de *Copaifera langsdorffii* e caurenol
- Tabela 13** Avaliação da migração celular de camundongos tratados com LPS e/ou diferentes doses do extrato de *C. langsdorffii*
- Tabela 14** Avaliação da motilidade tratointestinal com carvão ativo em camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii* e caurenol

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de abreviações.....	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Esquemas	xi
Lista de Tabelas.....	xii
1 Introdução.....	1
1.1 Produtos naturais na descoberta de fármacos	1
1.2 O gênero <i>Copaifera</i>	1
1.3 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	3
1.4 Biotransformação	4
1.5 Atividades analgésica e anti-inflamatória.....	6
2 Objetivos.....	10
3 Material e métodos.....	11
3.1 Obtenção do extrato e seu fracionamento	11
3.2 Análise cromatográfica	12
3.3 Fracionamento da fração em acetato de etila	13
3.4 Fracionamento da fração aquometanólica	15
3.5 Isolamento e purificação de compostos em CLAE Preparativo	16
3.6 Obtenção dos compostos 5 e 6.....	17
3.7 Redução do composto 5.....	17
3.8 Biotransformação	18
3.8.1 Obtenção do epóxido de ácido caurenóico	18
3.8.2 Seção experimental.....	19
3.9 Identificação estrutural dos compostos isolados	21

3.10 Ensaio para avaliação da atividade biológica	21
3.10.1 Animais	21
3.10.2 Avaliação de toxicidade aguda e locomotora.....	21
3.10.3 Ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético	22
3.10.4 Ensaio de formalina	23
3.10.5 Ensaio de placa quente.....	23
3.10.6 Ensaio da medida do edema de pata de rato	23
3.10.7 Ensaio de migração celular	24
3.10.8 Ensaio de motilidade intestinal.....	24
3.10.9 Avaliação da citotoxicidade in vitro.....	25
3.10.10 Avaliação da estimulação da produção de óxido nítrico e citocinas	25
3.10.11 Análise Estatística.....	26
4 Resultados	27
4.1 Perfil cromatográfico do extrato e frações de <i>C. langsdorffii</i>	27
4.2 Fracionamento em cromatografia contracorrente da fração em acetato de etila da partição do extrato hidroalcoólico	29
4.2.1 Determinação estrutural dos compostos isolados da fração em acetato de etila	31
4.3 Fracionamento da fração aquosa do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i>	35
4.3.1 Elucidação dos compostos obtidos da cromatografia em gel	36
4.4 Obtenção dos compostos 5 e 6.....	43
4.4.1 Elucidação dos compostos 5 e 6.....	43
4.5 Produtos da biotransformação.....	45
4.5.1 Elucidação dos compostos obtidos por biotransformação	46
4.6 Ensaio para avaliação da atividade biológica	53
4.6.1 Toxicidade aguda e avaliação da atividade locomotora	53
4.6.2 Ensaio de contorção abdominal.....	54

4.6.3 Ensaio de formalina	56
4.6.4 Ensaio de placa quente.....	57
4.6.5 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina.....	58
4.6.6 Ensaio de edema de pata induzido por dextrana	59
4.6.7 Ensaio de migração celular	60
4.6.8 Ensaio de motilidade intestinal	62
4.6.9 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	63
4.6.10 Avaliação de NO e citocinas	64
5 Discussão.....	68
6 Conclusões	79
Referências bibliográficas.....	80
Anexos	92

1 Introdução

1.1 Produtos naturais na descoberta de fármacos

No desenvolvimento de fármacos empregados na medicina humana os produtos naturais são de grande importância e são considerados como excelentes fornecedores de princípios ativos para benefício da saúde. Os produtos naturais tem um papel dominante no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças humanas e os estudos de plantas medicinais devem levar ao desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos que ostentem o tripé segurança, eficácia e qualidade, já que estes são usados por grande parte da população como primeiro cuidado farmacêutico. A investigação farmacológica de princípios ativos de plantas medicinais tem proporcionado importantes avanços na abordagem terapêutica de várias patologias, sendo que várias substâncias encontradas nas plantas têm sido utilizadas como ferramentas úteis em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos (Rates, 2001). Além disso, muitas fontes de produtos naturais são pouco estudadas como os ambientes marinho e microbiológico.

Do período de 1981 a 2010 o ano de 2010 apresentou a segunda menor quantidade de moléculas aprovadas, no qual foram aprovadas 20 moléculas perdendo apenas para 2004 com 19 moléculas aprovadas. Contudo, das 20 moléculas aprovadas, 50% são produtos naturais ou derivados. Deste modo, produtos naturais como fonte de novas moléculas combinado com metodologias sintéticas e a manipulação de caminhos biossintéticos continuarão sendo a melhor fonte para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos (Cragg e Newman, 2012). Portanto, estudar a composição química de extratos visando o conhecimento da composição química destes é condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de fontes naturais.

1.2 O gênero *Copaifera*

A família Leguminosae Juss., também chamada de Fabaceae Lindley, é uma das mais importantes famílias botânicas, sendo que a classificação mais moderna divide-se em três sub-famílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Judd et al., 1999). Deste modo, pelo sistema de Engler, o gênero *Copaifera* L. pertence à família Leguminosae e sub-família Caesalpinioideae Kunth (Veiga e Pinto, 2002).

Segundo o Index Kewensis (1996) o gênero *Copaifera* possui 72 espécies distribuídas em regiões tropicais da América Latina que se estende do México ao norte da Argentina e também em regiões tropicais da África Ocidental. Destas, 16 espécies são somente encontradas no Brasil, principalmente nas regiões amazônica e centro-oeste, sendo as espécies mais comuns a *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguay), *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. Guianensis* Desf. (Guianas), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia) e *C. confertiflora* Bth (Piauí) (Veiga Jr. et al., 2000).

Popularmente conhecidas como “copaibeiras ou pau d’óleo”, as copaíbas são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (Andrade, et al., 2000).

As copaibeiras são árvores de crescimento lento que podem alcançar de 25 a 40 metros de altura e podem viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente avóide, a qual é envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (Pio Corrêa, 1984). A floração e frutificação das copaíbas ocorrem a partir dos 5 anos de idade, em plantios. A floração ocorre entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro. Na época da frutificação, as copaíbas são visitadas no período diurno por aves, as quais são as maiores responsáveis pela dispersão de suas sementes, as quais engolem o arilo e regorgitam a semente (Veiga Jr. et al., 2000).

Dados quimiotaxonômicos demonstram que a família apresenta compostos como ácidos graxos, saponinas triterpênicas, taninos, gomas, terpenóides, alcalóides quinozilidínicos, antraquinonas, alcalóides pirrolizidínicos e flavonóides. A taxonomia das leguminosas tem evoluído principalmente devido ao estudo da classe dos flavonóides, visto a importância destes metabolitos secundários e de sua diversidade metabólica nessa família. Além das flavonas e flavonóis, que são flavonóides comumente encontrados em plantas de outras famílias, os membros da desta família contêm chalconas, 2,3-diidroflavonóides, flavanonas, isoflavonóides, rotenóides, e flavanas (Hegnauer e Grayer-Barkmeijer, 1993).

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar enorme diversidade de metabólitos secundários. Estudos realizados com o óleo de copaibeiras revelam em grande maioria a presença de sesquiterpenos e diterpenos (Braga et al., 1998). Todos os diterpenos descritos na literatura pertencem a um dos esqueletos caurano, labdano ou clerodano (Cascon e Gilbert, 2000).

1.3 *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii Desf. é conhecida popularmente como “copaíba” (Fig. 1). É uma árvore que pode ser encontrada em todo o Brasil da Amazônia a Santa Catarina (Paiva, et al., 2002) e possui quatro diferentes variedades *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxae* *glabra* (Veiga e Pinto, 2002). A sua morfologia, anatomia, conservação, maturação foram estudadas por Eira e colaboradores (1992) e Barbosa e colaboradores (1992). A identificação botânica é difícil, sendo realizada pelas características das flores como a pubescência mais escuras e viscosos (Veiga e Pinto, 2002). Esta espécie é polinizada no período diurno, com grande participação de *Trigona* sp e *Apis mellifera*. Somente na espécie *C. langsdorffii* o óleo-resina é vermelho e é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes desta árvore, sendo extraído através de uma pequena incisão a cerca de um metro de altura de seu tronco (Veiga e Pinto, 2002). Este óleo é considerado, na sua forma in natura, um valioso remédio na medicina popular, sendo utilizado como anti-inflamatório e anti-infeccioso no tratamento de varias condições tais como: dores de garganta, infecções urinária e pulmonar (Paiva, et al., 1998). Além disso, mostrou atividade antitumoral contra carcinomas IMC em camundongos (Ohsaki et al., 1994). Estudos fitoquímicos sobre o óleo-resina desta espécie revelaram a presença de óleos essenciais contendo principalmente sesquiterpenos como β -cariofileno, óxido cariofileno, β -elemano, curcumeno, entre outros (Braga, et al., 1998) e uma mistura de diterpenos.

Figura 1 – A: *Copaifera langsdorffii*; B: Folhas e sementes de *C. langsdorffii*. (Souza, 2011)

C. langsdorffii apresenta alto potencial medicinal e econômico para o desenvolvimento de novos fitoterápicos. Existem mais de 200 trabalhos publicados envolvendo *C. langsdorffii* Desf. Contudo, estão relacionadas com o óleo que é exsudado do tronco destas árvores ou com a fração volátil obtida desse produto abordando as utilizações e aplicações do óleo-resina e de seus respectivos componentes voláteis. Portanto, estudos sobre a composição química e atividade farmacológica a partir dos extratos de folhas e ramos ainda são escassos.

1.4 Biotransformação

A química sustentável tem como grande desafio manter a continuidade do desenvolvimento com a diminuição dos danos causados ao meio ambiente. Nesse aspecto, as biotransformações se enquadram dentro da “química verde” que é definida como a concepção, desenvolvimento e aplicação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente (Hai-Feng *et al.*, 2008). Esta área tem desenvolvido novas ferramentas para melhorar a precisão e ampliar processos de produção que reduzam os gastos de energia e de matérias-primas, bem como reduzam resíduos tóxicos (Lenardão *et al.*, 2003).

Biotransformação é o uso de sistemas biológicos para realizar transformações químicas em substâncias que não constituem seus substratos naturais (Hanson, 1972) que ocorrem por um conjunto de reações químicas catalisadas por enzimas, células ou tecidos de origem vegetal,

microbiana ou animal (Giri *et al.*, 2001). Essas reações apresentam grandes vantagens como o uso de temperaturas brandas, velocidades de reações superiores, quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (Silverman, 2000) e são processos que têm sido usados pela humanidade por milhares de anos, como por exemplo, para a conversão do etanol a ácido acético (vinagre) por povos da Babilônia (Mesopotâmia), Egito, México e no Sudão (Leresche & Meyer, 2006).

Um exemplo são reações enantioseletivas observadas em muitas biotransformações que propiciam a obtenção de produtos puros a partir de misturas racêmicas. As reações de biotransformação podem ser conduzidas em temperatura amena e em condições normais de temperatura e pressão e, na maioria dos casos, não há necessidade de proteger grupos funcionais (Patel, 2002). Além disso, as reações que não são possíveis de serem realizadas por processos químicos tradicionais são facilmente executadas em processos de biotransformação (Qi-He *et al.*, 2009).

O uso de biotransformações para modificações em produtos naturais e sintéticos tem sido cada vez mais reportado, sendo que os fungos têm chamado o interesse de pesquisadores devido ao grande número de espécies que ainda são pouco estudadas ou ainda desconhecidas e principalmente a interação de fungos com plantas que é favorecida por climas úmidos. O isolamento e o estudo destes fungos podem ser considerados como um primeiro passo para a compreensão da origem de alguns metabólitos secundários em plantas e da ativação de enzimas específicas em fungos que possuem habilidade de catalisar reações régio e estereosseletivas (Borges *et al.*, 2009).

Vários fármacos são atualmente produzidos por biotransformação. A síntese do inibidor da HIV protease, Atazanavir, conta com uma etapa na qual um intermediário é obtido pela redução microbiológica diastereosseletiva realizada pelo microrganismo *Rhodococcus erythropolis* SC 13845 e na síntese do paclitaxel (taxol), a cadeia lateral em C- 13 é obtida pela redução microbiológica seletiva de um intermediário pelos microrganismos *Hansenula polymorpha* SC 13865 e *Hansenula fabianii* SC 13894 (Patel, 2008).

Diterpenos caurânicos constituem uma classe de substâncias ricas em atividades biológicas, se tornando um alvo interessante para biotransformações. Os fungos *Gibberella fujikuro* (Fraga *et al.*, 2007), *Mucor pumbeus* (Fraga *et al.*, 2003), *Rhizopus stonflier* (Silva *et al.*, 2002), *Verticillium lecanii* (Vieira *et al.*, 2002) têm sido usados para biotransformação de

cauranos, tendo gerado modificações estruturais como hidroxilações, epoxidações, reduções, oxidações e rearranjos de esqueleto.

A utilização de micro-organismos como modelo de metabolismo de xenobióticos para mamíferos tem sido reportada para simular condições do metabolismo de mamíferos de diversos compostos para prever vias metabólicas, quando o isolamento dos metabólitos de mamíferos é difícil (Smith and Rosazza 1974; Venisetty and Ciddi 2003). Entre esses micro-organismos, o fungo *Beauveria sulfurescens* provou ser capaz de gerar vários metabólitos por biotransformação. De acordo com Johnson e colaboradores (1992) *B. sulfurescens* mostrou ser efetivo na oxigenação seletiva do *N*-acetil-1-aminoadamantano dando produtos monoidroxilados. Além disso, a biotransformação do ácido gálico conduziu a metilações e glicosilações em diferentes hidroxilas (Hsu et al., 2007). Assim, devido ao potencial do fungo *B. sulfurescens* e a grande variação de metabólitos obtidos com a biotransformação de cauranos, essa metodologia foi escolhida para a obtenção de metabólitos de um composto isolado de *C. langsdorffii*, o qual foi epoxidado antes da biotransformação.

1.5 Atividades analgésica e anti-inflamatória

A nocicepção pode ser induzida por traumas ou processos inflamatórios e pode ser avaliada em modelos animais de nocicepção, os quais podem ser utilizados na avaliação de substâncias com propriedades analgésicas (Carvalho, 2004). A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão (Cheng et al., 2002). A dor pode ser derivada do processo inflamatório ou pode ser nociceptiva, neurogênica e neuropática (Millan, 1999). Em pacientes outras manifestações dolorosas são frequentes como a sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso (hiperalgesia) ou a dor em resposta a um estímulo não doloroso (alodínia). Além disso, a dor pode ser aguda ou crônica, sendo que a dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (Park e Vasko, 2005) e a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos caracterizando-se pela persistência, o que muitas vezes dificulta o tratamento (Besson, 1999).

Os processos inflamatórios são respostas fisiológicas do organismo a diferentes estímulos e o processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e

celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou traumas teciduais. As causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável, sendo identificados como agentes biológicos (como bactérias, vírus, protozoários); agentes químicos (como ácidos, álcalis, terebentina, formaldeído, carragenina); agentes físicos (como calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, traumatismos, fraturas, incisões) e agentes imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro).

O processo inflamatório é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, do fluxo sanguíneo, da dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os sinais típicos da inflamação que são rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor (Gilroy et al., 2004). As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma (Williams et al., 1983). Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão e transmigração (Munro, 1993; Wahl et al., 1996).

Na reação inflamatória estão envolvidos vários tipos de células, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos. Estas células liberam uma grande variedade de substâncias endógenas ou mediadores químicos durante o processo inflamatório, onde se destacam as prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrienos, citocinas e outras.

Dentre os mediadores inflamatórios estão os eicosanoides que são os leucotrienos e as prostaglandinas, as quais promovem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema. Um exemplo de prostaglandinas é a PGE_2 que exibe funções reguladoras para o controle da inflamação imune-mediada, fibrose, estresse oxidativo e melhora a evolução de nefrites (Kvirkvelia et al., 2013). Essas são substâncias provenientes da metabolização do ácido araquidônico por parte das enzimas lipoxigenases e ciclo-oxigenases. Deste modo, os fármacos analgésicos e/ou anti-inflamatórios não esteroidais são conhecidos por atuarem via inibição das ciclo-oxigenases, prevenindo a formação de prostaglandinas e tromboxanos (Vane e Botting, 1998).

As cininas, no sítio inflamatório, são responsáveis pela permeabilidade capilar resultando na dilatação vascular e aumento de permeabilidade, ativação do Complemento, dor e aderência de neutrófilos, em consequência da ação direta sobre o endotélio da microvasculatura, ou ainda indireta, através da liberação de outras substâncias pró-inflamatórias como a síntese de citocinas. As cininas são peptídeos de 8-14 aminoácidos derivados das globulinas plasmáticas. Estes peptídeos medeiam a inflamação através da ativação constitutiva dos receptores de bradicinina B₁ e B₂. O receptor B₂ é constitutivo e está presente em tecidos centrais e periféricos. Estes parecem estar implicados na maioria das ações fisiológicas das cininas. O receptor B₁ é geralmente ausente em tecidos normais e animais saudáveis, mas pode ser induzido e super expresso durante uma lesão tecidual ou administração de alguns mediadores inflamatórios (Antoni, 2011; Siebeck et al., 1998).

As citocinas anteriormente chamadas de linfocinas são proteínas secretadas que regulam importantes respostas celulares como proliferação e diferenciação. Elas são mediadores químicos polipeptídicos produzidos por linfócitos, monócitos e macrófagos. As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons, interleucinas (IL), fator estimulador de colônias, fator de necrose tumoral (TNF), e fator de transformação de crescimento. Elas têm como funções: regular a duração e intensidade das respostas específicas, recrutar células efetoras para as áreas onde se desenvolvem respostas e induzir a geração e maturação de novas células a partir de precursores (Starr et al., 1997).

Outros mediadores são as endotelinas que tem atividade através da interação com receptores ETA, ETB ou ETC. Estes mediadores peptídicos estão relacionados ao desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, inflamação e dor, dentre outros (Schiffrin, 2005) e o fator de ativação plaquetário (PAF) que é formado pela acetilação do lisofosfolipídio que é obtido pela hidrólise do ácido aracdônico. O PAF é um potente lipídio bioativo que atua por ligação específica em receptor acoplado à proteína G (Ishii e Shimizu, 2000). Assim, esses mediadores químicos estão envolvidos na nocicepção e no edema associados aos processos inflamatórios.

A principal molécula-alvo dos anti-inflamatórios não esteroidais é a enzima COX. A inibição da atividade das COXs é um dos principais mecanismos de ação de diversos fármacos como o ácido acetilsalicílico (aspirina®) e a indometacina. Desta forma, seu efeito anti-

inflamatório deve-se principalmente à inibição da produção de prostaglandinas como a prostaglandina PGE₂, PGD₂ e PGI₂, bem como dos tromboxanos (Fitzgerald, 2003).

Produtos naturais desempenham importante papel no tratamento de doenças inflamatórias. Considerando que as substâncias disponíveis no mercado apresentam grande número de efeitos colaterais e indesejáveis, a procura por substâncias analgésica e/ou anti-inflamatória tem sido uma prioridade nas indústrias farmacêuticas desde 1960, sendo estimulada pela venda destes que é estimada em vários bilhões de dólares (Paiva et al., 2003).

Deste modo, uma importante estratégia de pesquisa na busca por novos fármacos anti-inflamatórios é o estudo de plantas medicinais (Neto et al., 2005) tradicionalmente usadas para aliviar a dor e a inflamação. Estes estudos podem resultar na identificação de metabólitos secundários ativos, os quais poderão ainda ser modificados estruturalmente tendo em vista o melhoramento de suas atividades biológicas.

2 Objetivos

Visando contribuir para o conhecimento dos metabólitos secundários das folhas de *C. langsdorffii*, do seu potencial analgésico e anti-inflamatório e a busca de novos compostos por biotransformação, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Avaliar a composição química das folhas de *C. langsdorffii*, por meio do fracionamento de seus extratos, o isolamento, a purificação e a determinação estrutural de seus metabólitos secundários majoritários;
- b) A epoxidação e biotransformação pelo fungo *Beauveria sulfurens* de um composto isolado de *C. langsdorffii*;
- c) Avaliar as atividades analgésica, anti-inflamatória e antiespasmódica do extrato e compostos isolados das folhas de *C. langsdorffii*.

3 Material e métodos

3.1 Obtenção do extrato e seu fracionamento

O material vegetal para a obtenção dos extratos brutos, visando o estudo fitoquímico foi coletado no Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto-SP (licença de coleta n°35143-1). As exsicatas da espécie foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo e depositadas no herbário (SPFR 10120) do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP, Ribeirão Preto. As folhas foram coletadas e posteriormente secas e estabilizadas em estufa de ar quente e circulante (modelo 170 N° 370/82 Soc. Fabre LTDA) a 40°C e submetidas à moagem em moinho de facas previamente limpo (Fig. 2).

Figura 2 - Folhas de *Copaifera langsdorffii* em estufa de ar circulante para secagem; B: folhas secas; C: folhas trituradas.

O material vegetal em pó (2 kg) foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica na proporção 7:3. O solvente (7,5 L/kg de material vegetal) foi renovado após 48 horas e o material vegetal foi submetido a mais duas macerações a cada 24 horas, também com renovação do solvente. A solução foi concentrada em rotaevaporador e liofilizada, com rendimento de 33,9%. Na figura 3 é mostrado o fracionamento do extrato bruto. Para tanto, 50 g do extrato foram ressuspendidos em MeOH : água (9:1) e particionados com hexano. Em seguida, a fração MeOH : água (3:2) foi particionada com CH_2Cl_2 e AcOEt (3 x 600 mL), obtendo-se frações do extrato em polaridades crescentes em: hexano (13%), CH_2Cl_2 (12%), AcOEt (27%), hidrometanólica

(48%), *n*-butanólica (13%) e aquosa (35%) (Fig. 3). Os solventes foram concentrados em rotaevaporador e a fração aquosa foi mantida em estufa de ar circulante por 14 dias à temperatura de 40°C. Após esse período o extrato foi liofilizado para completa eliminação da água.

Figura 3 - Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*

3.2 Análise cromatográfica

O extrato e frações de *C. langsdorffii* foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatoplasas de sílica gel 60 F 254 (Merck) (5 ou 10 cm). As amostras foram eluídas com a fase móvel Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético: Água (100: 11: 11: 27). As cromatoplasas foram reveladas com solução etanólica de NP (ácido difenilbórico- β -etilamino éster, Sigma) 1% (p/v) e observadas em luz ultravioleta em comprimento de 365 nm.

Os perfis cromatográficos do extrato e frações foram obtidos por CLAE utilizando-se cromatógrafos analíticos da Shimadzu, sendo um acoplado a um computador contendo o software LC-Solution Single instalado e outro acoplado a um computador contendo o software ClassVP versão 5.02.

As análises foram realizadas usando coluna analítica de fase reversa C₁₈ CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm (Shimadzu) com diâmetro das partículas de 5 µm e pré-coluna analítica de fase reversa C₁₈ SGE. Como eluentes da fase móvel foram utilizados A: água e 0,01% de ácido trifluoracético (TFA) e B: MeOH. O gradiente de polaridade da fase móvel foi de 15-50% de B em 45 min, 50-90% de B até 65 min, de 90-15% de B até 70 minutos, seguidos por mais dois minutos de 15% de B. O extrato e frações foram solubilizados em MeOH: água (1:1) na concentração de 1 mg/mL, filtrados em filtro de 0,45 µm e 20 µL dessa solução foram injetados no cromatógrafo. Vazão: 1 mL/min. Detecção do UV-DAD registrada em quatro comprimentos de ondas.

3.3 Fracionamento da fração em acetato de etila

As separações por cromatografia contracorrente (CCC) foram realizadas utilizando um aparelho de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – High-speedy counter-current chromatography) Quatro CCC^{TM} MK 5 & MK 6 (AECS-QuikPrep^{TM} Ltd., Reino Unido) equipado com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em PTFE (Bobina 1: coluna A: 208 mL, d.i. 3,2 mm e coluna B: 29 mL, d.i. 1,0 mm; Bobina 2: coluna C: 102 mL, d.i. 2,0 mm e coluna D: 105 mL, d.i. 2,0 mm) (Fig. 4). As separações foram realizadas utilizando as colunas C (102 mL) e D (105 mL), d.i. 2 mm, conectadas entre si no sentido cabeça-cauda-cabeça-cauda. A alça do injetor de 10 mL foi utilizada para introdução das amostras no sistema cromatográfico. A velocidade de rotação utilizada foi de 850 rpm, e temperatura ajustada em 35 °C. Os solventes utilizados foram bombeados por bomba de fluxo contínuo. O sistema de solventes foi bifásico, sendo a fase inferior/aquosa utilizada como fase estacionária e a fase superior/orgânica como fase móvel, o que significa tratar de modo de eluição normal.

Figura 4 – Cromatografo de contracorrente de alta velocidade (CCC)

A seleção dos solventes foi determinada pela solubilidade de 1 mg da amostra em 1 a 5 mL dos solventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH, acetonitrila, *n*-BuOH e água. Os solventes que apresentaram melhor solubilidade foram MeOH e *n*-BuOH, solubilizando completamente a amostra em um volume de 1 mL. Os solventes AcOEt e água apresentaram baixa solubilidade, solubilizando a amostra somente com 5 mL. Os outros solventes não solubilizaram a amostra. Os solventes MeOH e BuOH foram selecionados para compor, cada um, uma das fases do sistema. Para obter equilíbrio entre as fases, os solventes hexano e água foram selecionados por serem imiscíveis e não solubilizarem a amostra. O sistema de solventes proposto foi: hexano: *n*-BuOH (fase superior/orgânica): MeOH: água (Fase inferior/aquosa) em proporção (v/v) 0,2 : 1 :: 0,2 : 1. A proporção adequada dos solventes do sistema foi determinada após vários testes em proveta graduada com adição de 5 mg da fração em AcOEt em pequena quantidade do sistema de solventes (2-4 mL) em equilíbrio, seguida de agitação manual por 30 segundos. Após decantação, volumes iguais (5 μL) de ambas as fases foram aplicados em placa de CCD. As placas foram eluidas e depois reveladas, para avaliar a quantidade relativa das substâncias de interesse nas fases superior/orgânica e inferior/aquosa. Para orientar essa pesquisa, além da distribuição equilibrada dos compostos de interesse nas duas fases ($0,5 < K < 2$), houve necessidade de desfazer a emulsão formada e de minimizar o tempo de decantação das fases.

Para determinar o coeficiente de partição (K) uma alíquota da amostra foi adicionada ao sistema de solventes. As fases foram separadas em funil de separação e os solventes evaporados. As amostras obtidas das fases foram ressuspensas em 1 mL de metanol e submetidas a CLAE

analítica. O K foi calculado pela razão da área do pico na fase aquosa pela área do pico na fase orgânica.

A amostra (2,5 g) foi solubilizada, com auxílio de aparelho de ultrassom, em 10 mL da mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes. O sistema de solventes selecionado para a separação foi preparado na proporção definida (1060 mL) e equilibrado em funil de separação a temperatura ambiente por uma hora. As fases, superior e inferior foram separadas e desgaseificadas em aparelho de ultrassom por 10 minutos. Utilizou-se a eluição em modo normal (fase estacionária é a fase mais densa), vazão de 2 mL/min., com a rotação ligada. A fase móvel foi bombeada até que nenhum excesso de fase estacionária saísse das colunas. A retenção de fase estacionária foi então calculada pela razão do volume de fase retida pelo volume total de capacidade das colunas, dado em percentagem. Em seguida, a amostra foi injetada na alça de injeção.

3.4 Fracionamento da fração hidrometanólica

A cromatografia por permeação em gel foi efetuada com a fração hidrometanólica em coluna de vidro de 4 cm Ø x 100 cm, utilizando-se gel de sephadex LH 20 (25-100 µ Sigma-Aldrich®) (300 g) como fase estacionária e MeOH: água (95:5) como fase móvel (Fig. 5). A fração (4 g) foi solubilizada em 10 mL da fase móvel e, em seguida, transferida para tubo do tipo Falcon e centrifugada a 7500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado (0,2 g) e sobrenadante (3,8 g) foi filtrado em algodão e aplicado no topo da coluna. A fase móvel foi mantida em um balão volumétrico acima da coluna sendo dispensada gota a gota. A vazão foi de 5 mL/min. Foram coletadas 45 frações com 25 a 50 mL. Em seguida, as frações foram reunidas em 12 frações (F1a-F12a), de acordo com o perfil cromatográfico em CCD e concentradas em evaporador rotatório.

Esse processo cromatográfico foi realizado novamente, seguindo-se a mesma metodologia, porém com maior massa dessa fração. A fração hidrometanólica (6,5 g) foi solubilizada em 15 mL da fase móvel e após centrifugação o precipitado (1,9 g) foi descartado e o sobrenadante (4,6 g) foi filtrado para ser aplicado no topo da coluna. De forma semelhante, o processo levou a obtenção também de 12 frações (F1b-F12b), reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD.

Figura 5 – Fracionamento de fração aquometanólica em coluna preenchida com gel de sephadex

3.5 Isolamento e purificação de compostos em CLAE Preparativo

Análise dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das frações obtidas em acetato de etila e aquosa possibilitou a seleção daquelas que apresentaram picos majoritários em valores de área. Logo, estas frações foram submetidas à CLAE no modo preparativo (CLAE-PREP) para purificação.

A CLAE-PREP foi realizada em coluna C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm; Shimadzu), em cromatógrafo preparativo Shimadzu acoplado a um computador contendo o software LC-Solution Single instalado. Para a purificação das frações obtidas em CCC, o gradiente de polaridade da fase móvel foi de 5-15% de B em 20 min., 15-25% de B até 40 min., vazão de 9 mL/min. Foram coletados apenas os picos com maiores áreas dessas frações. Para as frações obtidas do fracionamento da fração aquosa, quantidades de 40 a 100 mg foram solubilizadas em 500 µL de MeOH: água (35:65), e filtradas em filtro de 0,45 µm e, em seguida, foram injetadas no cromatógrafo. Como eluentes da fase móvel foram utilizados A: água e 0,01 % de ácido

trifluoracético (TFA) e B: MeOH. O gradiente de polaridade da fase móvel utilizado para purificar frações obtidas da cromatografia por permeação em gel foi de 5-15% de B em 20 min., 15-25% de B até 40 min., de 25-34% de B até 75, de 34-50% de B até 85 min., de 50-80% de B até 115 min., seguidos por 5 minutos de 5% de B, vazão de 9 mL/min.

O solvente das amostras contendo as substâncias isoladas foram evaporados em SpeedVac (Thermo Savant). A pureza dos picos obtidos em CLAE analítica foi avaliada através dos espectros no UV e da percentagem de área nos cromatogramas em diferentes comprimentos de onda.

3.6 Obtenção dos compostos 5 e 6

Os compostos **5** e **6** foram anteriormente isolados por nosso grupo de trabalho (Souza, 2011) da fração em acetato de etila do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*. Com o objetivo de se utilizar o composto **6** nos ensaios biológicos, uma alíquota de 10 g da fração obtida em acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna clássica para isolamento do composto **5** e do composto **6**. A cromatografia foi realizada em coluna de 6 cm de diâmetro interno, 40 cm de comprimento e empacotada com 200g de sílica gel 60H.

Dessa coluna foi obtida a fração 1 resultante da coleta de 2 L de Hex: AcOEt 9:1 e 2 L de Hex: AcOEt 8:2. Após a coleta da fração 1, onde se encontravam os compostos de interesse, a cromatografia foi interrompida. A fração 1 foi submetida a cristalização com hexano para obtenção do composto **5**. O material restante da fração 1 após cristalização foi seco e submetido a uma segunda cromatografia com 100% de hexano em coluna clássica de 4 cm de diâmetro interno, 30 cm de comprimento e 70 g de sílica dando o composto **6** (Souza, 2011).

3.7 Redução do composto 5

Para a obtenção de maior massa do composto **6** foi realizada a redução do composto **5**, utilizando-se 472 mg (1,563 mmol) de **5**, 534,128 mg (14,056 mmol) de LiAlH_4 e 18,3 mL de tetraidrofurano (Synth) devidamente seco com sódio metálico (Vetec, pedaço). A solução permaneceu em refluxo por 2 horas a 100° C. Após o refluxo foram adicionados 4 mL de acetato de etila, 2 mL água deionizada e solução de NaOH (Batista et al., 2007). Posteriormente, a

solução foi particionada com acetato de etila. À fração orgânica foi adicionado sulfato de sódio para eliminação de água com posterior filtração e recuperação do solvente.

Esquema 1 – Mecanismo de obtenção do composto **6** (Sykes, 1985a)

3.8 Biotransformação

A biotransformação foi realizada com o objetivo de se obter novos compostos que pudessem apresentar melhor atividade nos ensaios. No mesmo sentido, o ácido caurenóico foi epoxidado para aumentar a possibilidade de obtenção de compostos mais bioativos.

3.8.1 Obtenção do epóxido de ácido caurenóico

O epóxido do ácido caurenóico (**7**) foi preparado a partir da epoxidação do composto ácido caurenóico (**5**) (Fraga et al., 1994). Para tanto, 300 mg do ácido *ent*-caur-16-en-19-oico foram dissolvidos em CH_2Cl_2 (8 mL), sendo adicionados 300 mg do ácido 3-cloroperbenzóico (Aldrich, lote 273031) e foi mantido em refluxo por 2 h em temperatura ambiente. A mistura foi diluída em CH_2Cl_2 , seguida de lavagem com solução de Na_2HCO_3 a 10%, secagem com Na_2SO_4 e remoção do solvente.

Esquema 2 – Mecanismo de obtenção do composto **7** (Sykes, 1985b)

3.8.2 Seção experimental

Beauveria sulfurescens ATCC 7159-F foi cultivada em meio sintético contendo glicose (50 g), KH_2PO_4 (5g), MgSO_4 (1 g), NH_4NO_3 (0,48 g), e elementos traços { 1 mL de uma solução aquosa de H_3BO_3 (1,43 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,9 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,11 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,195 g), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g), e H_2SO_4 (1 mL) em 500 mL} em água destilada (1 L). O pH foi ajustado para 4,0 e o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min.

Na figura 6 são apresentadas as etapas do processo de biotransformação, sendo que para obtenção dos esporos, o fungo foi cultivado em placas de Petri em meio ágar de dextrose de batata por 14 dias. Após o término do período de incubação, o material foi removido por raspagem e adicionado em tubo falcon de 50 mL com 30 mL de água estéril. A mistura foi agitada em vortex, filtrada e a absorbância analisada a 600 nm.

Fermentações em escala experimental foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 50 mL de meio de cultura em shaker rotatório operando a 220 rpm a 28 °C por 24 h. Em cada frasco foi adicionado uma solução de esporo a 1% com absorbância de 0,8 a 600 nm. O substrato **7** (2,0 mg em 50 µL de etanol) foi adicionado após 48 h de incubação. O caldo fermentativo de *B. sulfurescens* contendo 50 µL de etanol sem o substrato e o meio de cultura contendo substrato sem fungo foram os controles. Amostras foram coletadas dos três

frascos em vários intervalos de tempo, neutralizados com NaOH, extraídas com AcOEt e os extratos foram analisados em CCD para verificar o desaparecimento de **7**.

Biotransformação em larga escala foi realizada sobre as mesmas condições, mas em 6 frascos de 2 L contendo 1 L de meio em cada frasco. Um total de 240 mg do substrato foi dissolvido em 6 mL de etanol, os quais foram distribuídos em quantidades iguais nos três frascos e incubados por 5 dias. Em seguida, a massa micelial foi removida por filtração, lavada com água, os lavados foram combinados com o filtrado, neutralizados com NaOH e extraídos com AcOEt. A massa micelial foi liofilizada e extraída com AcOEt.

Figura 6 – Etapas do processo de biotransformação: Do cultivo do fungo a extração

Para auxiliar o isolamento, o extrato do caldo de cultura (50 mg) foi tratado com iodometano e K_2CO_3 a temperatura ambiente para a produção de metil esters dos produtos. A mistura foi cromatografada em coluna de fase reversa C-18 (1,5 g) empacotada com 10% CH_3CN em água e eluída com quantidades crescentes de CH_3CN em água. Os compostos obtidos foram analisados e isolados por CCD e purificadas em CLAE-PREP em coluna C-18 eluída com 30 a 90% de CH_3CN em água por 50 min.

3.9 Identificação estrutural dos compostos isolados

Os metabólitos isolados e purificados foram submetidos à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e UV, além de técnicas espectrométricas bidimensionais, tais como HMBC, HMQC, COSY e NOE. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetros Brucker–Avance DRX₅₀₀, operando em 500 MHz ou 400 MHz (RMN de ^1H) e 125 MHz ou 100 MHz (RMN de ^{13}C). As amostras foram preparadas em dimetil sulfoxido deuterado (DMSO-*d*6), clorofórmio deuterado e piridina da marca Aldrich.

3.10 Ensaios para avaliação da atividade biológica

3.10.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Mus Musculus* machos da linhagem Swiss com aproximadamente 25 g de peso corpóreo (p.c.) e *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar machos com aproximadamente 150 g p.c. provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* à ração e água. As amostras obtidas de *C. langsdorffii* foram administradas aos animais via *gavage* (oral) no volume de 10 mL/kg em dose única, sendo seis o número de animais por grupo de tratamento em todos os ensaios. Os protocolos utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética do Campus da USP de Ribeirão Preto (Protocolo nº 09.1.1373.53.6; 11.1.471.53.7).

3.10.2 Avaliação de toxicidade aguda e locomotora

Grupos de camundongos Swiss (n=4) receberam as doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg de Cop, 3, 10, 30 e 100 mg/kg de quercitrina (quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo), 3, 10, 30 e 100 mg/kg de afzelina (canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo) e 10, 20 e 40 mg/kg de caurenol em veículo salina (NaCl 0,9%) e foram observados durante as primeiras quatro horas a fim de

avaliar-se sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, letargia e agressividade), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, piloereção e mortalidade (Lapa et al, 2008). Diariamente, pelo período de 14 dias, os animais foram avaliados e a ocorrência de morte anotada para cada dose administrada; no 15º dia todos os animais foram submetidos à eutanásia, seguida de necropsia e observação macroscópica dos órgãos. A metodologia seguiu as exigências da OECD 423 (Botham, 2004).

Para avaliação da atividade locomotora foi usado uma caixa plástica medindo 45 x 45 x 20 cm, com o fundo dividido em nove áreas iguais (15 x 15 cm). O número de áreas cruzadas pelas quatro patas dos animais (n = 6 por grupo) foi determinado em sessões de 6 minutos e tomado como índice comportamental. Os animais tratados com veículo foram considerados o controle. Os protocolos de tratamentos utilizados nesse ensaio foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Unicamp (CEEA) sob protocolos No. 2247-1, 2248-1, 2249-1 e 2250-1.

3.10.3 Ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético

O teste de contorções foi realizado com camundongos Swiss (Lima et al., 2007) e é baseado no teste de Koster et al. (1959), no qual as amostras foram avaliadas em diferentes doses para a triagem da fração mais ativa e, para tanto, foram utilizados os seguintes grupos de tratamento: tratamento nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* (Cop), bem como as doses de 52 mg/kg p.c. da fração em hexano, de 48 mg/kg p.c. da fração em diclorometano, 108 mg/kg p.c. da fração em acetato de etila, 52 mg/kg p.c. da fração em butanol e 140 mg/kg p.c. da fração aquosa, correspondentes a seus rendimentos (13, 12, 27, 13 e 35%, respectivamente) em relação à dose de 400 mg/kg p.c. de Cop. Quercitrina e afzelina foram administrados na dose de 100 mg/kg p.c. Caurenol foi administrado nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de. Indometacina na dose de 10 mg/kg (Sigma-Aldrich, lot 115K0689) foi usada como controle referência. As amostras foram administradas 60 minutos antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (0,1 mL/10 g do animal). As respostas contorsivas (contorções no abdômen e extensão das patas traseiras) foram quantificadas durante 20 min. Os resultados obtidos foram comparados com o grupo controle e expressos como a média $\pm$ D.P. do número de contorções.

3.10.4 Ensaio de formalina

Os animais, camundondos Swiss (Lima et al., 2007), receberam 20 μ L de solução de formalina 2,5% na sua pata direita, de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Após a administração de formalina, os animais foram isolados e observados pelos primeiros 5 minutos (fase inicial - dor neurogênica) e entre 15-30 minutos (fase final - a dor inflamatória). Os tratamentos foram as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c. de Cop e de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol. As amostras foram administradas 60 minutos antes do início do ensaio. Morfina (2,5 mg/kg p.c., i.p., administrada 30 minutos antes da análise) e indometacina (10 mg/kg p.c.) foram utilizadas como medicamentos de referência.

3.10.5 Ensaio de placa quente

O ensaio foi realizado em camundongos Swiss, o qual envolveu a exposição dos camundongos a uma superfície quente, estando de acordo com a literatura (Andrade et al., 2007). O aparelho de placa quente (Ugo Basile DS37, Itália) foi mantido a $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Os animais foram individualmente expostos e o tempo gasto para lambear a pata (tempo de latência) foi registrado. O tempo limite foi de 20s. As medições foram realizadas em 0, 30, 60 e 90 min. após o tratamento. Foram testadas as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c. de Cop. Morfina (4,0 mg/kg p.c., i.p., Pasmodex, lot 29386101) foi administrada como composto de referência.

3.10.6 Ensaio da medida do edema de pata de rato

No método utilizado, semelhante ao descrito por Ferreira (1979), foram usados ratos Wistar machos (Andrade et al., 2007), pois o tamanho das patas dos ratos proporcionou menor erro na leitura do que quando usado camundongos. O teste consiste na aplicação de 0,1 mL de carragenina (100 μ g/pata, Sigma-Aldrich, lote 116K0105) ou dextrana (60 μ g/pata, Sigma-Aldrich, lote 091M13302V) na pata direita posterior dos ratos, sendo a outra pata utilizada como controle, na qual foi injetado igual volume de solução salina. Os grupos de tratamento receberam água destilada (controle), indometacina 10 mg/kg p.c. ou acetato de dexametasona 1 mg/kg p.c. (Atirus Magistran, lot 402.06/2009) solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 3%, bem como as diferentes doses de Cop (100, 200 e 400 mg/kg p.c.) e as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de

caurenol. As amostras foram administradas 60 minutos antes da injeção da carragenina ou dextrana e o edema foi medido por cinco horas em intervalos de uma hora para carragenina e por duas horas em intervalos de 30 minutos para dextrana. Para a medida do edema foi utilizado pletismômetro de pata (Insight EFF 304) e a inibição da inflamação foi calculada pela diferença de volume entre as patas de cada animal, em comparação com o grupo controle.

3.10.7 Ensaio de migração celular

Para esse ensaio foi utilizado o método descrito por Santos et al. (2003) e Ferrandiz e Alcaraz (1991). Os animais, ratos Wistar, foram tratados com as diferentes doses de Cop (100, 200 e 400 mg/kg) 1 hora antes da aplicação intraperitoneal de 100 ng/cavidade de lipopolissacarídeo (LPS (Mants, *Escherichia coli* 0101:B4. Lot 2630) solubilizados em água deionizada. Acetato de dexametasona 1 mg/kg p.c. foi utilizado como composto de referência.

Após 4 horas, os animais foram eutanasiados e a cavidade abdominal foi lavada com 10 mL de PBS 1x pH 7.2 [NaCl 80g, KCl 2g, KH₂PO₄ 2g, Na₂HPO₄ 12.77g, 1L de água deionizada (10x)] + 0,1% de heparina. Uma alíquota de 20 µL do lavado foi adicionado a 380 µL de Turk (Azul de metileno 2 mg, ácido acético 15 mL, água deionizada 485 mL) para contagem total de células em câmara de Neubauer. O número de células por mm³ foi obtido pela fórmula: N de cel= $n \times 1/0,4 \times 20$. Para contagem diferencial, o lavado foi centrifugado por 10 min a 224 x g e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspensionado em 300 µL de Albumina 3% (Nutricell), plaqueadas em lâminas de vidro e após fixadas com metanol foram coradas com corante de Rosenfeld. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico para contagem diferencial de células.

3.10.8 Ensaio de motilidade intestinal

Os camundongos Swiss foram submetidos a jejum de 16 horas com livre fornecimento de água. Os animais foram tratados com as doses de 100, 200 e 400 mg/kg de Cop, 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol e água salina. Como controle referência foi usado 2,5 mg/kg de atropina (intraperitoneal). O Carvão ativado foi administrado após 60 minutos da aplicação das amostras e a eutanásia após 30 minutos da administração do marcador. A mensuração do trânsito intestinal

foi realizada relacionando o trajeto percorrido pelo carvão em razão da medida da região gastropilórica até a junção iliocecal de cada animal (porcentagem de trânsito intestinal) (Pol et al., 1994).

3.10.9 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Os macrófagos foram obtidos a partir da injeção de PBS 1x gelado (5 mL x 3) na cavidade abdominal de camundongos Swiss eutanaziados. O lavado peritoneal foi centrifugado (400 g durante 10 min a 10 °C) e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em meio RPMI 1640 (Gibco^{TM}, lote 1104330) com 1% de gentamicina. O número total de células e a viabilidade foram determinadas em câmara de Neubauer utilizando azul de tripano. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (Zellkultur testplatte 96F, 92096, Switzerland) a uma concentração de 2×10^5 células/poço e incubadas durante 24 h em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio RPMI-c, Gibco^{TM}, lote 210100K) numa incubadora com uma atmosfera úmida de 5% de CO² a 37 °C.

A citotoxicidade foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando o ácido 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983). As células foram incubadas com 0,02% de DMSO (controle), a Cop (30, 60 e 120 µg/mL), caurenol (1, 3, 9, e 27 µg/mL), LPS (2 µg mL) e todas as concentrações de Cop e caurenol associadas com LPS durante 24 h. As culturas foram incubadas com 5% de MTT com RPMI-c por 4 h. Em seguida, 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e a placa mantida à temperatura ambiente até a solubilização completa do precipitado. Absorbância foi medida a 570 nm com espectrofotômetro (mQuanti, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), sendo diretamente proporcional à viabilidade celular. A citotoxicidade de Cop e caurenol foi expressa como a porcentagem da citotoxicidade observada em relação às células do controle não estimuladas.

3.10.10 Avaliação da estimulação da produção de óxido nítrico e citocinas

Para avaliação da estimulação da produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10, os macrófagos foram obtidos e cultivados como descrito no item 3.4.9. Os potenciais inflamatório e anti-inflamatório de Cop (30, 60 e 120 µg/mL) e caurenol (9, 3 e 1 µg/mL) foram analisados utilizando células pré-estimuladas ou não com LPS (0,4 µg/mL). Duas

horas após a estimulação com LPS, Cop e caurenol foram adicionados em diferentes concentrações. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados em congelador a -20 °C. As células não estimuladas foram utilizadas como controle.

3.10.11 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças entre os grupos foram comparadas através do teste de Tukey (não paramétrico). Os dados foram expressos como a média $\pm$ D.P. (desvio padrão), sendo $P < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Perfil cromatográfico do extrato e frações de *C. langsdorffii*.

O resultado da partição líquido-líquido de Cop apresentou maiores rendimentos (p/p) para a fração em AcOEt (27 %) e fração aquosa (48 %) sugerindo composição do extrato majoritariamente por substâncias de média e alta polaridades.

Perfis cromatográficos de Cop e frações demonstraram a complexidade do perfil metabólico (Fig. 7). A fração em AcOEt e a fração aquosa, por serem frações bastante representativas do extrato bruto, foram escolhidas para serem submetidas aos processos cromatográficos para isolamento.

Figura 7 – Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD de Cop e das frações em CH₂Cl₂, em AcOEt e fração aquometanólica. Comprimentos de onda: 257 nm, 280 nm e 360 nm. Coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm); Fase móvel: água e 0,01 % de ácido trifluoracético (TFA) e B: MeOH; Eluição gradiente: 15-50 % de B em 45 min, 50-90 % de B até 65 min, de 90-15 % de B até 70 minutos seguidos por mais 2 minutos de 15 % de B; vazão: 1 mL/min.

4.2 Fracionamento em cromatografia contracorrente da fração em acetato de etila da partição do extrato hidroalcoólico

A proporção (v/v) de solventes adequada foi hexano: *n*-BuOH 1:1 (fase superior/orgânica) e MeOH: água 0,4:1 (Fase inferior/aquosa), a qual apresentou tempo de decantação de 25 s. A proporção dos volumes das fases móvel e estacionária para o sistema de solventes desenvolvido foi de 2,2 : 1,2 (fase orgânica : fase aquosa).

Os valores dos coeficientes de partição obtidos para os compostos **1** ($K = 0,6$) e **2** ($K = 0,95$) foram calculados a partir dos dados da área dos picos obtidos nos cromatogramas das fases superior e inferior do sistema de solventes (Fig. 8). O modo de eluição foi normal e, portanto, a fase móvel foi eluída no sentido cauda-cabeça. A retenção da fase estacionária antes da injeção da amostra foi de 85 % (176 mL).

Figura 8 – Cromatogramas das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior) usados para cálculo do coeficiente de partição

Foram coletadas 41 frações com a rotação ligada e 10 frações com a rotação do aparelho desligada (*wash off*). As frações coletadas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (Fig. 9), e analisadas por CLAE analítica. O processo foi realizado duas vezes com a finalidade de se obter massa para os ensaios biológicos.

O fracionamento de 2,5 g da fração em AcOEt por CCC resultou em 6 sub-frações: F₈₋₁₄ (320 mg), F₁₅₋₂₃ (215 mg), F₂₄₋₂₆ (65 mg), F₂₇₋₃₃ (93 mg), F₃₄₋₄₁ (267 mg) e F₄₂₋₅₁ (570 mg), sendo que as sub-frações F₁₅₋₂₃ e F₃₄₋₄₁ correspondiam majoritariamente aos compostos **2** e **1**, respectivamente.

Figura 9 – Análise em CCD das frações coletadas em CCC

As sub-frações F₁₅₋₂₃ e F₃₄₋₄₁ foram analisadas em CLAE analítica e mostraram uma pureza relativa em percentagem de área dos cromatogramas dessas frações, resultando em torno de 90 % para cada fração. Na fração F₁₅₋₂₃ 90% correspondia ao composto **2** e os 10 % de impureza correspondiam principalmente ao composto **1**, e em F₃₄₋₄₁ 90% correspondiam ao composto **1** e os 10% de impureza correspondiam principalmente ao composto **2**. Dessa forma, as duas frações foram purificadas em CLAE-PREP de fase reversa, obtendo-se os compostos **1** (108,9 mg) e **2** (94,5 mg) com purezas em percentagem de área dos cromatogramas acima de 95% (Fig. 10).

Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD dos compostos purificados **1** (*tr*: 15,6 min.) e **2** (*tr*: 17,9 min.) e seus respectivos espectros em UV. Comprimentos de onda: 257 nm. Coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m); Fase móvel: A: água e B: MeOH; gradiente de eluição de 35-80 % de B em 20 minutos, 80-35 % até 21 minutos, e mais 4 minutos de 35 % de B; Vazão de 1 mL/min.

4.2.1 Determinação estrutural dos compostos isolados da fração em acetato de etila

Figura 11 – Estruturas químicas dos compostos **1** e **2**

Na tabela 1 são mostrados os dados de RMN do composto **1**. De acordo com a literatura (Nugroho et al. 2009), os sinais com deslocamentos químicos (δ) 6,20 (s; 1 H) e 6,39 (s, 1 H) sugerem a presença dos hidrogênios aromáticos, H-6 e H-8, no anel A e substituições nas posições 5 e 7, geralmente possuindo uma constante pequena referente ao acoplamento de hidrogênios meta correlacionados. Já os sinais δ 6,86 (d; $J = 8,3$; 1 H), 7,25 (d; $J = 8,3$) e 7,30 (s; 1 H) são relativos ao anel B. Estes sinais são relativos a hidrogênios orto e meta, indicando que o anel B pode estar substituído nas posições 3'/4', 2'/4', 4'/5' ou 4'/6'. Esses sinais juntamente com os sinais de RMN de ^{13}C são característicos da substituição em C-3' (δ 145,22) e C-4' (δ 148,51) do anel B, sendo característicos da quercetina (Andersen e Markham, 2006). No espectro de RMN de ^{13}C desse composto foram observados 21 sinais de carbono, sendo 15 atribuídos ao flavonol quercetina. Essa informação associada às obtidas no espectro de RMN de ^1H possibilitou inferir que os sinais remanescentes poderiam se referir a hidrogênios e carbonos de açúcar. Sabendo-se que o deslocamento químico do C-2 da quercetina é de aproximadamente 146,9 ppm (Andersen e Markham, 2006). A substituição do açúcar foi determinada na posição C-3 pelo deslocamento químico observado no espectro de RMN de ^{13}C para o C-2 de δ 157,21, pois a glicosilação no C-3 pode aumentar o deslocamento químico do C-2 até acima de 9 ppm. O deslocamento químico do carbono C-6'' δ 17,04 e a análise do mapa de contornos de HMBC (dados não mostrados), aliadas aos dados da literatura (Puri et al., 1994) permitiram determinar que o açúcar corresponde à raminose. Em raminosídeos, a configuração da ligação glicosídica é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica. Esses dados associados com os dados da literatura permitiram a identificação do composto **1** como quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) (Fig. 11).

O composto **2** apresentou sinais semelhantes ao composto **1**. Na tabela 1 são mostrados os dados de RMN e na figura 11 a estrutura química do composto **2**. Pode-se observar a presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,20 (d; $J = 2,0$; 1 H) e 6,41 (d; $J = 2,0$; 1 H) como no composto **1** indicando substituições em C-5 e C-7. Diferente do composto **1**, o composto **2** apresenta sinais em δ 6,91 (d; $J = 8,8$; 2 H), 7,74 (d; $J = 8,8$; 2H). Esses sinais indicam substituição em C-4' pois integram para 2. A hidroxilação na posição 4' exerce efeito mesomérico doador de elétrons na posição orto. Assim, atribuiu-se o sinal de deslocamento químico δ_{H} 6,91 aos hidrogênios simétricos das posições 3' e 5' do anel B, enquanto que o sinal de deslocamento químico δ 7,74 se refere aos hidrogênios simétricos das posições 2' e 6'. Os

sinais característicos de açúcar no espectro RMN ^1H comparando com o número e deslocamentos dos sinais de carbonos no espectro de RMN de ^{13}C permitiram a identificação de uma molécula de açúcar. Deslocamento químico acentuado em C-2 confirmou O-hidroxilação em C-3. O deslocamento químico do carbono C-6'' δ 18,04 e a análise do mapa de contornos de HMBC (dados não mostrados), aliadas aos dados da literatura (Puri et al., 1994) permitiram determinar que o açúcar corresponde à ramnose. Esses dados revelaram a presença do composto canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) no extrato de *C. langsdorffii*.

Tabela 1 – Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos **1** e **2** obtidos em DMSO-*d*6 e dados da literatura

1				2				
#	δ ^1H	δ ^{13}C	* δ ^1H	* δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	* δ ^1H	* δ ^{13}C
2		157,21		156,87		157,19		156,94
3		134,16		133,80		134,18		133,71
4		177,67		177,84		177,69		177,89
5		161,25		161,65		161,26		161,63
6	6,20 [1; s]	98,75	6,20 [1; d; 2,0]	99,19	6,20 [1; d; 2,0]	98,75	6,22 [1; d; 2,5]	99,21
7		164,0		164,6		164,38		164,60
8	6,39 [1; s]	93,65	6,39 [1; d; 2,0]	94,17	6,41 [1; d; 2,0]	93,75	6,45 [1; d; 4,5]	94,38
9		156,44		157,05		156,49		157,30
10		103,92		104,99		104,06		104,42
1'		121,05		121,67		120,48		121,37
2'	7,30 [1; s]	115,62	7,55 [1; d; 2,0]	115,74	7,74 [1; d; 8,8]	130,56	8,00 [1; d; 7,5]	131,37
3'		145,22		145,20	6,91 [1; d; 8,8]	115,39	6,89 [1; d; 7,5]	115,60
4'		148,51		148,86		160,01		160,37
5'	6,86 [1; d; 8,3]	115,45	6,86 [1; d; 8,5]	116,77	6,91 [1; d; 8,8]	115,39	6,89 [1; d; 7,5]	115,60
6'	7,25 [1; d; 8,3]	120,68	7,54 [1; dd; 2,0 e 8,5]	122,05	7,74 [1; d; 8,8]	130,56	8,00 [1; d; 7,5]	131,37
1''	5,25 [1; s]	101,80	4,41 [1; s]	100,86	5,28 [1; d; 1,3]	101,77	4,44 [1; s (l)]	100,88
2''	3,97 [1; s]	70,03	3,46 [1; m]	70,50	3,97 [1; dd; 1,3]	70,06	3,47 [1; m]	70,43
3''	3,51 [1; dd; 9,1 e 2,6]	70,32	3,53 [1; m]	70,52	3,46 [1; dd; 3,0 e 9,1]	70,33	3,46 [1; m]	70,53
4''	3,15 [1; m]	71,12	3,45 [1; m]	70,96	3,13 [1; m]	71,12	3,45 [1; m]	71,00
5''	3,20 [1; m]	70,55	3,29 [1; m]	67,29	3,07 [1; m]	70,59	3,68 [1; m]	67,16
6''	0,81 [3; d; 6,1]	17, 47	1,11 [3; d; 5,0]	18,04	0,78 [3; d; 6,0]	17, 44	1,10 [3; d; 5,0]	18,01

Dados obtidos dos compostos **1** e **2**; * Nugroho et al. (2009)

4.3 Fracionamento da fração aquosa do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*

O fracionamento foi realizado em duas vezes utilizando-se diferentes massas da fração e a mesma coluna preenchida com gel de sephadex LH-20. O primeiro fracionamento da fração aquosa (3,8 g) resultou em 12 frações com perfis cromatográficos distintos obtidos por CLAE-UV-DAD. O procedimento cromatográfico foi realizado novamente com o objetivo de se aumentar a massa. A fração aquosa (4,5 g) também resultou em 12 frações, sendo o perfil de separação desta semelhante ao do primeiro fracionamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel

Subfrações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Subfrações	Peso (mg)	Rendimento (%)
F1a	74	1,9	F1b	90	1,9
F2a	637	16,5	F2b	367	8
F3a	617	15,9	F3b	1605	34,9
F4a	910	23,6	F4b	531	11,5
F5a	211	5,5	F5b	234	5,1
F6a	133	3,4	F6b	435	9,5
F7a	104	2,7	F7b	411	8,9
F8a	304	7,9	F8b	276	6
F9a	148	3,8	F9b	50	1,1
F10a	87	2,2	F10b	66	1,4
F11a	51	1,3	F11b	35	0,8
F12a	121	3,2	F12b	14	0,3

As frações (F5a, F6a, F7a, F8a, F9a e F10a) do primeiro fracionamento da fração aquosa (3,8 g) e as frações (F7b, F8b, F9b e F10b) do segundo fracionamento da fração aquosa (4,5 g) foram selecionadas, com base nas quantidades de massa e simplificação do perfil cromatográfico, para purificação em CLAE-PREP.

A cromatografia em CLAE-PREP das frações F5a, F6a e F7a resultaram no isolamento dos compostos **2** (6 mg; *tr* 40,10) e **3** (28 mg; *tr* 33,56), os quais foram analisados em CLAE analítico. As frações F7b, F8b, F9b e F10b após serem purificadas, resultou no composto **4** (25 mg; *tr* 30,99), o qual foi analisado em CLAE analítico (Fig. 12).

Figura 12 – Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD dos compostos **3** e **4** e seus respectivos espectros de UV. Comprimentos de onda: 257 nm. Coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m); Fase móvel: água e 0,01 % de ácido trifluoracético (TFA) e B: MeOH; Eluição gradiente: 15-50 % de B em 45 min, 50-90 % de B até 65 min, de 90-15 % de B até 70 minutos seguidos por mais 2 minutos de 15 % de B; Vazão: 1 mL/min.

4.3.1 Elucidação dos compostos obtidos da cromatografia em gel

Com o uso de cromatografia por permeação em gel de sephadex da fração aquosa e CLAE foram isolados e identificados os compostos **3** e **4**, sendo que na figura 13 são apresentadas as estruturas químicas e nas tabelas 3 e 4 são apresentados os dados de RMN destes compostos.

Figura 13 - Estrutura química dos compostos **3** e **4**

Os dados dos espectros de RMN do composto **3** estão listados na tabela 3 e a figura 14 ilustra a estrutura da molécula com suas correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e acoplamentos $^1\text{H} - ^1\text{H}$. A atribuição dos hidrogênios e carbonos foi realizada e posteriormente comparada com dados da literatura (Nishimura et. al, 1984). A presença de duas unidades galoil foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 100 ppm e 150 ppm, os sinais de hidrogênios meta correlacionados H-3' (δ 7,00; d; $J=1,7$) e H-7' (δ 6,94; d; $J = 1,7$), e H-3'' (δ 6,99; d; $J=1,7$) e H-7'' (δ 7,09; d; $J=1,7$). Correlação no mapa de contornos de HMBC foi observada entre esses hidrogênios com os carbonos carbonílicos C-1' (δ 165,3) e C-1'' (δ 164,5), respectivamente. A correlação no mapa de contornos de HMBC dos hidrogênios metílicos H-8' (3H, δ 3,75 ou 3,77) e H8'' (3H, δ 3,75 ou 3,77) com os carbonos C-4' e C-4'' (δ 147,8), indicou metoxilação nessas posições. A presença de dois carbonos metilênicos similares (C-2, δ 37,7 e C-6, δ 37,3), três carbonos metínicos próximos a oxigênio (C-3, δ 66,2; C-4, δ 73,8; C-5, δ 68,2) observados no mapa de contorno de HMQC, e um carbono quaternário (C-1, δ 73,6 obtido por meio do espectro de HMBC), juntamente com a presença do carbono carbonílico em baixo campo C-7 (δ 174,7), sugeriram a estrutura do ácido quínico. Esta foi confirmada a partir das correlações obtidas nos mapas de contornos de HMBC, COSY e HMQC. A configuração dos hidrogênios metilênicos de

C-2 foi determinada como H-2ax (δ_H 1,90) e H-2eq (δ_H 2,22) de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H . A atribuição individual dos hidrogênios metilênicos de C-6 não foi possível a partir dos dados obtidos neste espectro. A configuração H-4 (axial) foi determinada de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN ^1H ($J_{5eq,4ax}=2,4$; $J_{4ax,3ax}=7,5$). O H-5 (equatorial) foi determinado pelo valor da metade da largura do pico ($J_{1/2}$), igual a 20 Hz (Hou et al., 2000). O hidrogênio metínico H-3 (δ 4,22) mais blindados em relação ao hidrogênio H-5 (δ 5,48) indicou acilação na posição C-5. A acilação no C-4 foi confirmada pela correlação do H-4 (δ 5,04) com o C-1'' (δ 165,3). Portanto, as unidades galoil se encontram substituindo os hidrogênios das hidroxilas de C-3 e C-4 do ácido quínico. Deste modo o composto **3** foi identificado como ácido 4', 4''-dimetóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico.

Figura 14 - Correlações de HMBC e COSY mostradas para o composto **3**

Tabela 3 – Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto **3** (ácido 4',4''-dimetóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico) em DMSO-*d*₆ e dados da literatura

#	$\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	* $\delta^1\text{H}$	HMBC	COSY
1	73,6	75,5				
2	37,7	38,0	Hax 1,90 [1; dd; 12,8; 6,4] Heq 2,22 [1; m]	2,1 – 2,5 [2; m]	66,2; 73,6; 174,7	2,22; 4,22
3	66,2	68,5	4,22 [1; m]	4,50 [1, m]		1,90 1,90
4	73,8	75,2	5,07 [1; dd; 7,5; 2,4)	5,24 [1; dd; 9; 3]	68,2; 165,3	
5	68,2	68,7	5,48 [1; m]	δ 5,80 [1; m]		2,06; 2,25
6	37,3	39,0	Hax/eq 2,06 [1; m] Heq/ax 2,25 [1; m]	2,1 – 2,5 [2; m]	73,6	2,25; 5,48 2,06; 5,48
7	174,7	175,5	2,46 [OH; sl] 5,13 [OH; sl] 9,40 [OH; sl]			
1'	165,3	166,6				
2'	119,3	120,6				
3'	110,6	109,8	6,99 [1; d; 1,7]	7,11 [1; s]	110,8; 119,3; 139,5; 147,8; 165,3	
4'	147,8	145,5				
5'	139,5	138,7				
6'	145,3	145,5				
7'	110,8	109,8	7,09 [1; d; 1,7]	7,11 [1H; s]	119,3; 139,5; 145,3; 165,3	
8'	55,8		3,77 [3; s]		147,8	
1''	164,5	166,3				
2''	119,1	120,6				
3''	104,8	109,7	6,94 [1; d; 1,7]	7,05 [1; s]	105,0; 119,1; 147,8; 164,5	
4''	147,8	145,5				
5''	139,5	138,7				
6''	145,3	145,5				
7''	105,0	109,7	7,00 [1; d; 1,7]	7,05 [1; s]	104,8; 119,1; 139,5; 145,3	
8''	55,8		δ 3,75 [3; s]		147,8	

*Dados da estrutura do ácido 3,4-*O*-di-galoilquínico em Me₂CO-*d*₆ + D₂O (Nishimura et al., 1984)

Os dados dos espectros de RMN do composto **4** e dados da literatura (Nishimura et.al, 1984) estão listados na tabela 4 e a figura 15 ilustra a estrutura química com suas correlações ^1H - ^{13}C e acoplamentos ^1H - ^1H . A presença de três unidades galoil foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 100 e 150, os sinais de hidrogênios magneticamente equivalentes H-3' e H-7', e H-3''' e H-7''' e dos hidrogênios metacorrelacionados H-3'' e H-7''. A correlação no mapa de contornos de HMBC desses hidrogênios com os respectivos carbonos carbonílicos e com os carbonos quaternários das estruturas dos grupos galoil, juntamente com os dados de HMQC, permitiram atribuição dos hidrogênios e carbonos dessas unidades. Os dados de HMQC mostraram a ligação dos hidrogênios metilênicos ao C com deslocamento de 55,5. A correlação no mapa de contornos de HMBC dos hidrogênios metílicos H-8'' (3H, δ 3,53) com o carbono C-4'' (δ 147,7), indicou metoxilação em C-4'' dessa unidade galoil. A presença de dois carbonos metilênicos similares (C-2, δ 38,0 e C-6, δ 36,0), três carbonos metínicos ligados a oxigênio (C-3, δ 68,3; C-4, δ 72,0; C-5, δ 69,2) observados no HMQC e mais a presença do carbono carbonílico em baixo campo C-7 (δ 176,2) sugeriram a estrutura do ácido quínico. Esta foi confirmada com o auxílio das correlações obtidas no espectro de ^1H - ^1H COSY e HMBC. Os hidrogênios metilênicos de C-6 foram atribuídos como axial e equatorial. Os hidrogênios metilênicos de C-2, embora magneticamente diferentes, não geraram sinais que possibilitassem atribuí-los individualmente. Os hidrogênios metínicos H-3 (δ 5,72) H-4 (δ 5,32) e H-5 (δ 5,58) em campo baixo indicaram acilação nas posições C-3 e C-4 e C-5. A configuração H-4 (axial) foi determinada de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H ($J_{4\text{ax},5\text{eq}}=3,4$; $J_{3\text{ax},4\text{ax}}=9,2$). H-5 (equatorial) foi determinado pelas constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H do H-6 com J_{gem} de 14 e $J_{\text{ax e eq}}$ de 3,5. A correlação do H-6 com o C-5 em comparação com o J de H-6 confirmou δ_{H} 5,58 em 5 como equatorial. Portanto, os grupos galoil se encontram substituídos nas hidroxilas de C-3, C-4 e C-5 do ácido quínico. Os dados de HMQC da correlação de H-3'' (δ 6,97) com C-3'' (δ 110,7) e de H-7'' (δ 6,82) com C-7'' (δ 104,8), juntamente com a correlação de HMBC dos H-3'' e H-7'' com o C-1'', comparados com os dados de HMQC do C-1'' com o H-4 permitiram a determinação da ligação do galoil metoxilado ao C-4. Os dados de HMBC não permitiram a determinação da ligação de C1' e C1''' aos C-3 e C-5. Desse modo o composto **4** foi identificado como ácido 4-(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico.

Figura 15 – Correlações de HMBC e COSY mostradas para o composto **4**

Tabela 4 – Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto **4**, ácido 4-(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6 e dados da literatura.

#	δ_c	* δ_c	δ_H	* δ_H	HMBC	COSY
1	73,1	74,1				
2	38,0	38,1	2,17 [2; m]	2,0 -2,8 [2;m]	36,0; 68,3; 73,1	5,72
3	68,3	68,8	5,72 [1; m]	5,81 [1, m]		2,17; 5,32
4	72,0	72,1	5,32 [1; dd; 9,2; 3,4]	5,51 [1; dd; 9; 3]	68,3; 165,2	5,58; 5,72
5	69,2	69,7	5,58 [1; m]	5,81 [1; m]		2,02; 2,37; 5,32
6	36,0	36,2	Heq/ax δ 2,02 [1; dd; 14; 3,5] Heq/ax δ 2,37 [1; dd; 14; 3,5]	2,0 -2,8 [2; m]	69,2; 73,1	2,37; 5,58 2,02; 5,58
7	176,2	176,2				
1'	165,0	166,2				
2'	119,2	120,4				
3' e 7'	108,8	109,8	6,88 [2; s]	7,5 [2; s]	108,8; 119,2; 138,8; 145,6; 165,0	
4' e 6'	145,6	145,5				
5'	138,8	138,7				
1''	165,2	166,2				
2''	119,0	121,1				
3''	104,8	109,8	6,82 [1; d; 1,8]	7,16 [1; s]	110,7; 139,7; 147,7; 165,2	
4''	147,7	145,5				
5''	139,7	139,0				
6''	145,3	145,5				
7''	110,7	109,8	6,97 [1; d; 1,8]	7,16 [1; s]	104,8; 119,0; 139,7; 145,3; 165,2 147,7	
8''	55,5		3,53 [3; s]			
1'''	165,6	166,2				
2'''	119,8	120,4				
3'''e 7'''	109,1	109,8	7,02 [2; s]	7,8 [2; s]	109,1; 119,8; 138,6; 145,5; 165,6	
4'''e 6'''	145,5	145,5				
5'''	138,6	139,0				

*Dados da estrutura do ácido 3,4,5-*O*-tri-galoilquínico em Me₂CO-*d*6 + D₂O (Nishimura et.al, 1984)

4.4 Obtenção dos compostos 5 e 6

O fracionamento de 10 g da fração em acetato de etila foi realizado em coluna clássica fornecendo uma fração com 3 g. A fração foi submetida à cristalização com hexano resultando em 500 mg do composto **5**. O material restante da fração 1, após cristalização, foi seco e submetido a uma segunda cromatografia com 100% de hexano em coluna clássica, sendo obtidos 15 mg de **6** após cristalização com hexano. No processo de redução de 472 mg de **5** foram obtidos 422 mg de **6**.

4.4.1 Elucidação dos compostos 5 e 6

Na tabela 5 são mostrados os dados de RMN e na figura 16 a estrutura molecular dos compostos **5** e **6**. O espectro de hidrogênios (RMN de ^1H) para o composto **5** apresenta diferentes sinais na região de δ 0,97 a δ 2,20, indicando pouca oxigenação e/ou insaturação. Pode-se observar, nesse espectro, a presença de dois singletos em δ 4,80 e 4,74, integrados para 1H cada, os quais foram atribuídos aos hidrogênios da ligação dupla exocíclica entre os carbonos C-16 e C-17. Nesse espectro há presença de um singleto em δ 2,63 integrado para 1H referente ao hidrogênio H-13. Além destes sinais, observam-se dois singletos em δ 1,24 e 0,95, integrados para 3H cada, se referindo aos grupos metílicos H-18 e H-20. A associação dos dados de RMN com os dados da literatura permitiram identificar o composto **5** como ácido caurenóico.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6** são bastante semelhantes aos espectros do ácido caurenóico (**5**). Quanto ao espectro de ^1H , as principais diferenças são as presenças de dois sinais em δ 3,74 e 3,44 de $J = 10,9$ Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios hidrometilênicos H-19. Já com relação aos dados de RMN ^{13}C pode-se observar a presença de 20 sinais, destacando-se o C-19 carbinólico em δ 65,7, ao invés do grupamento ácido, o que possibilitou a determinação do composto **6** como caurenol.

Figura 16 – Estrutura molecular dos compostos **5** e **6**

Tabela 5 – Dados dos espectros de RMN obtidos para os compostos **5** (ácido caurenóico) e **6** (caurenol) obtidos em CDCl_3 e dados da literatura

5				6			
#	* δ_c	* δ_H	δ_H	* δ_c	* δ_H	* δ_c	δ_H
1	40,7	-	-	40,5	-	40,6	-
2	19,1	-	-	18,3	-	18,4	-
3	37,7	-	-	35,6	-	35,7	-
4	43,2	-	-	38,7	-	38,8	-
5	57,1	-	-	56,9	-	56,9	-
6	21,8	-	-	20,5	-	20,6	-
7	41,3	-	-	41,6	-	41,8	-
8	44,2	-	-	44,2	-	44,3	-
9	55,1	-	-	56,2	-	56,4	-
10	39,7	-	-	39,2	-	39,4	-
11	18,4	-	-	18,2	-	18,3	-
12	33,1	-	-	33,2	-	29,8	-
13	43,8	2,64 [s]	2,63 [1, s]	44,0	2,63 [s]	44,1	2,63 [1, s]
14	48,9	-	-	39,7	-	39,8	-
15	155,9	2,05 [m]	2,05 [2, m]	49,1	2,05	49,2	2,05 [2, m]
16	103,0	-	-	155,8	-	156,0	-
17	29,0	17a 4,79 [s] 17b 4,73 [s]	17a 4,80[1,s] 17b 4,74[1,s]	103,0	17a 4,79 [s] 17b 4,73 [s]	103,1	17a 4,79 [1, s] 17b 4,73 [1, s]
18	155,9	1,24 [s]	1,24 [3, s]	27,1	0,96 [s]	27,2	0,96 [3, s]
19	184,8	-	-	65,6	19a 3,74 [d, 10,9] 19b 3,43 [d, 10,9]	65,7	19a 3,74 [1, d, 10,9] 19b 3,44 [1, d, 10,9]
20	15,6	0,95[s]	0,95 [3, s]	18,1	1,01[s]	18,2	1,00 [3, s]

*Dados da literatura (Batista et al., 2007)

4.5 Produtos da biotransformação

O caldo de cultura foi particionado com AcOEt, o qual foi evaporado sobre pressão reduzida fornecendo o extrato em AcOEt (104,9 mg) como um pó amarelo. A massa micelial liofilizada foi extraída com AcOEt e evaporada fornecendo o extrato em AcOEt (6.3 g) como um xarope amarelo.

A eluição do extrato em AcOEt do caldo acetilado (50 mg) em coluna C-18 forneceu 12 frações. Em CCD analítica (10 x 20 cm) a fração 5 foi eluída duas vezes com AcOEt-MeOH 49:1 fornecendo o composto **12** (1.60 mg, 3,2%, R_f 0,54). A fração 8 foi submetida a purificação em CLAE em coluna C-18 para dar os compostos **11** (1,50 mg, 3%, t_R 23 min), **10** (1,10 mg, 2,2%, t_R 31.5 min) e **8** (1,30 mg, 2,6%, t_R 9 min). além disso, em CCD a fração 10 foi eluída três vezes com CH₂Cl₂-MeOH 97:3 e forneceu o composto **9** (4,00 mg, 8%, R_f 0,35)

O extrato em AcOEt da massa micelial (6 g) foi dissolvido em 80% de MeOH em água, particionado com hexano e o solvente removido sobre pressão reduzida para obter a fração em hexano (5,75 g) e a fração hidrometanólica (246 mg). A fração hidrometanólica (241 mg) foi dissolvida em 200 mL de AcOEt e tratada com solução de NaOH a 0,5 M (200 mL). A fase de AcOEt foi lavada completamente com água, seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido dando a fração neutra (186,4 mg). A fase aquosa foi acidificada com solução de HCl a 0,5 M (pH = 2), seguida de partição com AcOEt (3 x 200 mL), sendo que a fase em AcOEt foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi removido fornecendo a fração ácida (54 mg), a qual rendeu 27 mg de um composto após cristalização com hexano, o qual mostrou ser, após elucidação, referente o composto **9** na forma ácida. Na figura 17 é mostrado o fracionamento do extrato e o peso de cada fração e compostos obtidos.

Figura 17 – Frações e compostos obtidos do processo de biotransformação

4.5.1 Elucidação dos compostos obtidos por biotransformação

Na figura 18 é mostrado o composto **7** que foi obtido como um pó amorfo branco e identificado como $C_{20}H_{32}O_3$. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) apresentou sinais em δ_H 0,96 e 1,25 (cada 3H, s) que foram atribuídos as metílas em C-18 e C-20 e em δ_H 2,81 e 2,89 (cada 1H, d, $J = 4.7$) que foram atribuídos aos hidrogênios em C-17. Esses dados foram confirmados por comparação com dados da literatura (Fraga et al., 1994).

Com o uso de coluna de fase reversa, CCD e CLAE foram isolados e identificados os compostos de **8 – 12** do caldo de cultura. O composto **9** foi isolado do caldo de cultura e da massa micelial, contudo da massa micelial o composto foi isolado e identificado na forma ácida. Na figura 18 são apresentadas as estruturas químicas dos compostos **7** ao **12**. Na tabela 6 são apresentados os dados de RMN do composto **8** e na tabela 7 os dados de RMN dos compostos **9** ao **12**.

Figura 18 – Estrutura molecular dos compostos **7** ao **12**

O composto **8** foi obtido como um pó amorfo branco, com $[\alpha]_D$: $-33,6$ (c 0,70, MeOH) e HRMS-FAB: m/z $[M + H^+]$ calculado para $C_{21}H_{32}O_4$: 371.2192 e achado: 371.2193. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 5) junto com dados de HSQC de **8** revelaram a presença de um grupo metilênico oxigenado [δ_H 4,55 dd, ($J = 5,6, 1,2$ Hz); δ_C 61,2], um metino (δ_H 3,98 m; δ_C 74,4), um hidrogênio olefínico (δ_H 6,55 s; δ_C 13,8) e um carbono olefínico quartenário (δ_C 148,7), sugerindo que **8** consiste de um esqueleto *ent*-caurano com dois grupos OH e duas ligações duplas. O deslocamento dos sinais dos hidrogênios de CH_2OH (δ_H 4,55 dd) sugeriu que o carbono metilênico poderia estar ligado a um C olefínico (Wijeratne et al., 2012; Ohtani et al., 1992). O espectro de COSY de **8** mostrou um acoplamento alílico entre hidrogênios hidroximetílicos em δ 4,55 (dd, 2H) e hidrogênio olefínico em δ 6,55, enquanto que o ultimo

mostrou correlações de HMBC para carbonos em δ 54,2 (8-C), 42,0 (13-CH), 148,7 (16-C) e 6,2 (17-CH₂), sugerindo que a ligação dupla Δ^{15} e o CH₂OH no C-16. O hidrogênio carbinólico de CHOH em δ 3,98 (m) mostrou correlações em COSY com H₂-6 em δ 2,25 (m) e correlações em HMBC no C em δ 43,4 (9-C) sugerindo sua posição em C-7. As correlações de HMBC mostraram sinais de hidrogênios em δ_H 2,23 (H-5) e 1,58 (H-14 β) para δ_C 74,4 (7-C) também confirmando a presença de OH em C-7. A irradiação do sinal em δ_H 3,98 no experimento de NOEDIFF mostrou melhoria do sinal em δ_H 1,58 (H-14 β) sugerindo orientação β do 7-OH (Fig. 19). Assim a estrutura de **8** foi elucidada como metil 7 β ,17-diidroxient-caur-15-en-19-oate revelando a formação de um *ent*-caurano até então desconhecido, o ácido 7 β ,17-diidroxient-caur-15-en-19-oico como resultado da biotransformação de **7**.

Figura 19 - Correlações de HMBC e NOE mostradas para o composto **8**

Tabela 6 - Dados de RMN de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) de **8** em C₅D₅N

#	δ_H	δ_C	#	δ_H	δ_C
1	0,95 [m]	41,3 (CH ₂)	11	1,45 [m]; 2,06 [m]	20,1 (CH ₂)
2	1,85 [m]	19,5 (CH ₂)	12	1,54 [m]; 1,65 [m]	26,4 (CH ₂)
3	1,07 [m]; 2,33 [m]	38,9 (CH ₂)	13	2,77 [m]	42,0 (CH)
4		44,1 (C)	14	1,58 [m]; 2,02 [m]	43,3 (CH ₂)
5	2,23 [m]	47,5 (CH)	15	6,55	131,8 (CH)
6	2,25 [m]	29,9 (CH ₂)	16		148,7 (C)
7	3,98 [m, α -H]	74,4 (CH)	17	4,55 [5,6, 1,2; dd]	61,2 (CH ₂)
8		54,2 (C)	18	1,24 [s]	29,0 (CH ₃)
9	1,79 [m]	43,4 (CH)	19		178,6 (C)
10		40,3 (C)	20	0,98 [s]	15,9 (CH ₃)
OMe	3,69 [s]	51,5 (CH ₃)	7-OH	6,10 [4,0; d]	
			17-OH	6,37 [5,6; t]	

O composto **9** foi identificado como metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-oate por análise dos espectros de RMN e com APCIMS (modo +) m/z 333 $[M+H-H_2O]^+$ e 315 $[M+H-2 H_2O]^+$, revelando a presença do composto ácido 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-oico no extrato. A atribuição inequívoca da estereoquímica em C-16 foi possível pelo aperfeiçoamento do pico em δ_H 1,66 m (11 β -H) sob irradiação de um dos sinais do hidrogênio em C-17 (δ 4,17 d) no experimento de NOEDIFF realizado em d5-piridina que resolveu os sinais de H-11 e H-14 para esta experiência (Fig. 20). Destaca-se que os dados de RMN de ^{13}C de **9** em $CDCl_3$ são também comparáveis com os relatados por Este et al. 1987. Isto confirma a presença do ácido 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico no extrato, uma vez que ambos os dióis, **9** e o seu 16-epímero (como um produto secundário) foram encontrados no controle em que o fungo se encontra ausente, pode ser possível que a abertura do anel do epóxido foi realizada em condições ácidas fortes (pH 4) existente no meio, contudo o epímero do composto **9** não foi encontrado no produto da biotransformação.

Figura 20 - Correlações de NOE mostradas para o composto **9**

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($CDCl_3$) do composto **10** com os dos compostos **8** e **9** revelou que ele é um derivado de *ent*-caurano contendo 17- CH_2OH [δ_H 3,70, d (J = 6,8 Hz); δ_C 64,4], um $CHOH$ [δ_H 3,36 dd (J = 11,6 e 3,6 Hz); δ_C 75,9] e não possui a ligação dupla Δ^{15} . A correlação de COSY entre o sinal em δ_H 3,36 dd e dos hidrogênios em δ 1,76 m e 2,0 m (H_2 -6), bem como a correlação de HMBC observada para o hidrogênio em δ 1,11 para o carbono hidroximetilênico em δ 75,9 indicam a posição do OH em C-7. Além disso, é

evidenciado que H-7 é axial devido sua constante de acoplamento indicando que o grupo OH pode ser α orientado. A atribuição da estereoquímica em C-16 foi estabelecida pelo experimento de NOEDIFF em d_5 -piridina por causa dos hidrogênios em C-11, 12 e 14 que não são bem resolvidos em espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 . Em d_5 -piridina, os sinais referentes aos hidrogênios 17- CH_2OH e 7- CHOH foram deslocados para δ 4,08 e 3,66, respectivamente. A irradiação sobre o sinal em δ 4,08 no experimento de NOEDIFF revelou que os sinais em δ_{H} 2,65 m (H-16), 2,50 m (H-13), 1,92 m (H_2 -12) e 1,73 m (H_2 -11) foram melhorados, confirmando o 17 β - CH_2OH (Fig. 21). Assim a estrutura de **10** foi elucidada como metil 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oate com $[\alpha]_{\text{D}}$: -112,3 (c 0,6, MeOH) e APCIMS (modo +) m/z 333 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$. A comparação dos dados de RMN do composto **11** com os dos **8**, **9** e **10** indicaram que ele é também um derivado dihidroxilado. As correlações de COSY entre os sinais em δ_{H} 1,70 (m, H-5) e 2,00 (m, H_2 -6) e também o sinal em δ_{H} 3,63 (m, H-7) indicam que **11** seja um epímero C-7 de **10** com $[\alpha]_{\text{D}}$: -16,6 (c 0,80, MeOH) e APCIMS (modo +) m/z 333 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (Fig. 21). Assim, houve a produção dos *ent*-cauranos ácido 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico e ácido 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico como resultado de biotransformação de **7**. Eles são reportados como produtos de biotransformação do ácido 17-hidroxi-16 β -*ent*-cauran-19-oico por *Calonectria decora* tendo resultado na produção de 16-epímeros de ambos os compostos (Croft et al., 1974).

Figura 21 - Correlações deHMBC, COSY e NOE mostradas para os compostos **10** e **11**

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 do composto **12** com os do composto **9** revelaram que ele contém 17- CH_2OH [δ_{H} 3,62, d ($J = 10,8$ Hz), 3,71 d ($J = 10,8$ Hz); δ_{C} 66,3)], 16 α -OH, (δ_{C} 82,1, 16-C) e um ligante OH em um átomo de C quartenário em δ_{C} 77,6. A atribuição da estereoquímica em C-16 foi suportada pelos dados reportados por Yang et al. (2002) para um composto similar. Dados de HMBC mostram a correlação do sinal do hidrogênio em δ 0,92 (H_3 -20) com o carbono em δ_{C} 77,6 sugerindo que o OH esteja localizado em C-9 (Fig. 22). Estes dados conduzem para a identificação de **12** como metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oate e com APCIMS (modo +) m/z 349 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 331 $[\text{M}+\text{H}-2 \text{H}_2\text{O}]^+$ e 313 $[\text{M}+\text{H}-3 \text{H}_2\text{O}]^+$, revelando a presença do ácido 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico como um produto de biotransformação obtido do meio de cultura. A presença do ácido 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico tem sido reportada como uma aglicona obtida de grãos de café verde (Richter, 1977). Contudo, neste estudo apresenta-se a completa atribuição dos dados de RMN deste composto.

Figura 22 - Correlação de HMBC mostrada para o composto **12**

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **9**, **10**, **11**, e **12** em CDCl_3 .

#	9		10		11		12	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	0,77 [m]; 1,80 [m]	40,8 (CH_2)	0,74 [m]; 1,80 [m]	40,7 (CH_2)	0,86 [m]; 1,79 [m]	40,6 (CH_2)	1,47 [m]; 1,64 [m]	32,4 (CH_2)
2	1,40 [m]; 1,83 [m]	19,2 (CH_2)	1,42 [m]; 1,82 [m]	19,2 (CH_2)	1,42 [m]; 1,81 [m]	19,3	1,48 [m]; 1,86 [m]	19,1 (CH_2)
3	1,02 [m]; 2,15 [m]	38,2 (CH_2)	1,02 [m]; 2,18 [m]	38,1 (CH_2)	1,08 [m]; 1,85 [m]	39,3	1,00 [m]; 2,10 [m]	37,9 (CH_2)
4		43,9 (C)		43,8 (C)		43,5		44,2 (C)
5	1,04 [m]	57,0 (CH)	1,11 [m]	53,9 (CH)	1,71 [m]	47,4 (CH)	1,50 [m]	50,3 (CH)
6	1,75 [m]; 1,83 [m]	22,3 (CH_2)	1,76 [m]; 2,00 [m]	31,5 (CH_2)	1,97 [m]	29,2 (CH_2)	1,81 [m]	22,0 (CH_2)
7	1,44 [m]; 1,65 [m]	42,1 (CH_2)	3,36 [11,6; 3,6; dd]	75,9 (CH)	3,60 [m]	77,4 (CH)	1,38 [m]; 1,72 [m]	36,8 (CH_2)
8		44,8 (C)		50,1 (C)		48,4 (C),		50,0 (C)
9	0,99 [m]	55,8 (CH)	0,94 [m]	55,9 (CH)	1,38 [m]	50,3 (CH)		77,6 (C)
10		39,6 (C)		39,5 (C)		40,0 (C)		43,9 (C)
11	1,50 [m]; 1,60 [m]	18,7 (CH_2)	1,55 [m]	19,0 (CH_2)	1,56 [m]	18,8 (CH_2)	1,11 [m]; 1,98 [m]	29,7 (CH_2)
12	1,49 [m]; 1,58 [m]	26,3 (CH_2)	1,54 [m]; 1,60 [m]	26,7 (CH_2)	1,52 [m]	26,7 (CH_2)	1,52 [m]; 1,65 [m]	27,6 (CH_2)
13	2,03	45,4 (CH)	2,23 [m]	36,6 (CH)	2,20 [m]	37,1 (CH)	2,02 [m]	44,1 (CH)
14	1,59 [m]; 1,92 [m]	37,3 (CH_2)	1,53 [m]; 1,58 [m]	31,8 (CH_2)	1,02 [m]; 2,15 [m]	38,1 (CH_2)	1,76 [m]; 2,18 [m]	38,2 (CH_2)
15	1,44 [m]; 1,55 [m]	53,2 (CH_2)	0,96 [m]; 2,18 [m]	43,5 (CH_2)	1,08 [m]; 1,82 [m]	39,6 (CH_2)	1,11 [m]; 2,30 [m]	47,5 (CH_2)
16		82,1 (C)	2,14 [m]	38,2 (CH)	2,17 [m]	43,5 (CH),		82,1 (C)
17	3,67 [10,9; d]; 3,77 [10,9; d]	66,5 (CH_2)	3,70 [6,8; d]	64,4 (CH_2)	3,70, [7,6; d]	64,2 (CH_2)	3,62 [10,8; d]; 3,71 [10,8; d]	66,3 (CH_2)
18	1,14 [s]	28,9 (CH_3)	1,16 [s]	28,8 (CH_3)	1,15 [s]	28,8 (CH_3)	1,15 [s]	29,0 (CH_3)
19		178,2 (C)		178,0 (C)		177,9 (C),		178,3 (C)
20	0,80 [s]	15,5 (CH_3)	0,81 [s]	15,7 (CH_3)	0,81 [s]	15,5 (CH_3)	0,92 [s]	17,4 (CH_3)
OMe	3,62 [s]	51,3 (CH_3)	3,62 [s]	51,5 (CH_3)	3,63 [s]	51,4 (CH_3)	3,63 [s]	51,4 (CH_3)

4.6 Ensaios para avaliação da atividade biológica

4.6.1 Toxicidade aguda e avaliação da atividade locomotora

Na figura 23 são apresentados os resultados para o ensaio de campo aberto para as diferentes doses de Cop (30, 100, 300 e 1000 mg/kg p.c.), quercitrina (3, 10, 30 e 100 mg/mL), afzelina (3, 10, 30 e 100 mg/kg) e caurenol (10, 20 e 40 mg/kg).

Nas doses testadas, tanto o extrato quanto os compostos isolados não provocaram alterações locomotoras significativas quando comparadas ao grupo controle, indicando ausência de atividade central depressiva. Na avaliação da toxicidade aguda, não foram observadas alterações comportamentais e/ou fisiológicas como efeitos na locomoção, comportamento (agitação, letargia e agressividade), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, piloereção e mortalidade (durante 15 dias de observação) nas doses testadas, indicando ausência de toxicidade aguda.

Figura 23 - Número médio e desvio padrão de cruzamentos entre as áreas determinadas pelo ensaio de “campo-aberto” em 6 min. Os animais foram avaliados por 6 min. 1 h após o tratamento com extrato e compostos isolados.

4.6.2 Ensaio de contorção abdominal

Os dados sobre peso corpóreo obtidos nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na tabela 8. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para essa variável.

Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 8 e figura 24. Significativa redução no número de contorções abdominais foi observada nos grupos tratados com as diferentes doses de Cop quando comparados com o grupo controle negativo, variando de 29,7% a 40,3%.

A dose testada de cada fração obtida por partição líquido-líquido foi baseada no rendimento de cada fração para a dose de 400 mg/kg p.c. do extrato. As frações em hexano, diclorometano e acetato de etila foram significantemente diferentes do grupo controle, apresentando redução de 39,2, 38,6 e 36,9%, respectivamente. As frações butanólica e aquosa apresentaram pequena redução em relação ao grupo controle negativo, contudo não significativa.

Os compostos quercitrina e afzelina não apresentaram redução significativa em relação ao grupo controle na dose de 100 mg/kg p.c.. O composto caurenol apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle para as doses de 20 e 40 mg/kg p.c. com redução de 34,7 e 53,6% . Contudo, a redução apresentada pela dose de 10 mg/kg p.c. não foi significativa.

Para os ensaios seguintes apenas foram usadas as doses de 100, 200 e 400 mg/kg de Cop e as doses de 10, 20 e 40 mg/kg de caurenol. Os compostos quercitrina e afzelina não foram testados por não apresentarem atividade e a dose de 50 mg/kg de Cop foi retirada para limitar o número de três doses .

Tabela 8 – Número médio e desvio padrão de contorções abdominais e peso de camundongos tratados com diferentes doses de *C. langsdorffii* e suas frações

Tratamentos	Peso (mg) média±DP	Número de contorções média±DP	% de redução
Controle	26,1±3,5	60,1±8,5	-
Indometacina	26,0±3,7	24,7±5,8***	58,9
Cop 50	27,7±0,8	42,2±5,6*	29,7
Cop 100	27,2±0,4	39,7±7,4*	33,8
Cop 200	26,7±2,9	34,0±9,1***	43,3
Cop 400	26,0±2,1	35,8±8,1***	40,3
Fr Hex	35,2±1,4	36,5±9,6**	39,2
Fr Dicloro	26,0±0,0	37,7±10,4**	38,6
Fr ACOet	27,3±3,1	37,8±4,5**	36,9
Fr BuOH	29,0±0,9	51,7±10,8	13,9
Fr Aquosa	29,2±2,9	50,3±10,9	16,1
Quercitrina 100	30,5±1,4	52,5±9,0	12,5
Afzelina 100	30,2±1,5	48,7±6,0	18,9
Caurenol 10	22,5±1,0	41,7±17,2	30,6
Caurenol 20	24,2±1,7	39,2±14,1*	34,7
Caurenol 40	21,7±2,3	27,8±9,9**	53,6

Controle – Salina 0,9%; e 0,1ml de ácido acético a 0,6% / 10 mg p.c.; Indometacina –(composto referência) 10 mg/kg p.c.; Cop 50, 100, 200 e 400 – correspondem as doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Fr Hex – Fração em hexano (52 mg/kg p.c.); Fr Dicloro – Fração em diclorometano (48 mg/kg p.c.); Fr ACOet – Fração em acetato de etila (108 mg/kg p.c.); Fr BuOH – Fração em butanol (52 mg/kg p.c.); Fr aquosa – Fração aquosa (140 mg/kg p.c.); Quercitrina 100 - quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (100 mg/kg p.c.); Afzelina 100 - canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (100 mg/kg p.c.); Caurenol 10, 20 e 40 – correspondem as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c.; média±DP – média $\pm$ desvio padrão * Significativamente diferente do grupo controle em $P < *0,05$; **0,01 e ***0,001

Figura 24 - Efeito das diferentes doses do extrato de *C. langsdorffii*, frações e compostos isolados sobre o número de contorções abdominais. Os animais foram tratados e após 1 h foram avaliados por 20 após injeção de solução de ácido acético.

4.6.3 Ensaio de formalina

Os dados sobre peso corpóreo obtidos nos diferentes grupos de tratamento são apresentados na tabela 10. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para essa variável.

Os valores médios e o desvio padrão do tempo de lambida estão apresentados na tabela 10 e figura 25. Na primeira fase (0-5 min.) apenas o composto referência morfina apresentou redução significativa no tempo de lambida de pata, mostrando a eficiência do sistema teste e ausência de atividade do extrato e do caurenol na fase inicial (dor neurogênica). Na segunda fase (15-30 min) observou-se significativa redução no tempo de lambida de pata nos grupos tratados com as doses de 200 e 400 mg/kg p.c. de Cop e das diferentes doses de caurenol quando comparados com o grupo controle, indicando atividade significativa na segunda fase do ensaio (dor inflamatória). Os compostos indometacina e morfina foram significativamente diferentes do grupo controle na segunda fase do ensaio.

Tabela 10 - Número médio e desvio padrão do tempo de lambida de pata de camundongos tratados com solução de formalina a 0,6%

Tratamento	Peso (mg)	Tempo (s)		% de redução	
		0-5	15-30	0-5	15-30
Controle	30,3±2,2	87,05±30,05	314,37±83,23	-	-
Indometacina	30,8±1,6	73,97±41,09	171,94±90,42*	15,03	45,31
Morfina	31,0±1,3	29,40±11,56***	156,41±77,40*	66,23	50,25
Cop 100	29,7±2,1	66,17±11,46	211,43±133,33	23,99	32,74
Cop 200	29,8±1,5	80,84±16,52	143,01±52,82**	7,13	54,51
Cop 400	30,0±0,0	58,92±23,23	168,22±62,83*	32,32	46,49
Caurenol 10	25,2±2,0	68,83±16,25	163,84±59,75*	20,93	47,88
Caurenol 20	21,8±0,8	67,15±9,94	111,12±35,53***	22,86	64,65
Caurenol 40	24,2±2,8	66,92±20,35	113,33±33,09***	23,12	63,95

Controle – água destilada; Indometacina 10 mg/kg p.c.; Morfina 2,5 mg/kg p.c.; Cop 100, 200 e 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Caurenol 10, 20 e 40 – correspondem as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol; média±DP; * Significativamente diferente do grupo controle em $P < 0,05$; **0,01 e ***0,001

Figura 25 – Tempo de lâmbida de pata induzida por formalina em camundongos tratados com Cop e caurenol. A formalina foi administrada 1 h após o tratamento. Os animais foram avaliados por 5 min. para avaliação da dor neurogênica e de 15 a 30 min para avaliação da dor inflamatória.

4.6.4 Ensaio de placa quente

Na tabela 9 são mostrados a média do tempo de latência e o peso de camundongos tratados com Cop e morfina. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada no peso entre os grupos de tratamento. Na tabela pode-se observar que as três doses do extrato não foram capazes de aumentar o tempo de latência, indicando ausência de atividade analgésica. A morfina (4 mg/kg p.c.), usada como composto referência foi administrada via intraperitoneal e apresentou aumento significativo no tempo de latência quando comparado com o grupo controle.

Tabela 9 - Tempo de latência e peso de camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii*

Tratamentos	Tempo de reação em:				Peso (mg)
	0min	30min	60min	90min	
Controle	13,6±1,7	12,3±1,7	13,3±2,6	12,2±2,9	29,5±2,2
Morfina	14,2±1,2	20±0,0**	20±0,0**	20±0,0**	26,5±1,9
Cop 100	15,2±1,9	16,4±4,1	10,5±2,6	9,9±3,8	31,0±1,3
Cop 200	11,4±3,4	15,4±3,4	13,7±3,7	13,6±4,6	31,0±1,3
Cop 400	12,2±5,0	9,8±5,0	10,0±3,4	10,0±5,1	30,5±1,8

Controle – Salina 0,9%; Cop 100, 200 e 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Morfina – (4 mg/kg p.c.) n=3; resultados expressos em média ± desvio padrão ; *** Significamente diferente do grupo controle $P<0,001$

4.6.5 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

Os dados sobre peso corpóreo obtidos nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na tabela 11. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para essa variável.

Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 11 e figura 26. O grupo controle apresentou pico do edema em 3 horas, sendo o mesmo usado como base para o cálculo de redução. Uma redução significativa no valor do volume do edema foi observada nos grupos tratados com as diferentes doses de Cop e as diferentes doses de caurenol quando comparados com o grupo controle negativo. As diferentes doses do extrato e o caurenol apresentaram aumento na resposta em relação ao aumento da dose. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa, não mostrando efeito dose-resposta.

Tabela 11 - Número médio e desvio padrão do volume do edema de pata induzido por carragenina de ratos tratados com as diferentes doses do extrato de *Copaifera langsdorffii* e caurenol

Grupos	Relação do volume do edema em (mL):						% de redução
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	
Controle	0,02±0,06	0,13±0,11	0,60±0,12	0,70±0,08	0,65±0,14	0,56±0,17	-
Indometacina	0,00±0,02	0,16±0,10	0,36±0,12 ^a	0,39±0,13 ^a	0,48±0,12 ^c	0,39±0,08 ^c	44,2
Cop 100	0,01±0,01	0,10±0,08	0,37±0,09 ^a	0,48±0,08 ^a	0,51±0,12 ^c	0,48±0,10	31,5
Cop 200	0,00±0,02	0,14±0,08	0,27±0,17 ^a	0,47±0,10 ^a	0,51±0,12 ^b	0,42±0,17 ^b	32,9
Cop 400	0,01±0,04	0,16±0,08	0,28±0,14 ^a	0,37±0,10 ^a	0,31±0,10 ^b	0,35±0,12 ^b	47,6
Caurenol 10	0,00±0,02	0,17±0,09	0,34±0,20 ^a	0,40±0,19 ^a	0,28±0,06 ^a	0,23±0,06 ^a	43,0
Caurenol 20	0	0,15±0,08	0,27±0,08 ^a	0,26±0,11 ^a	0,27±0,11 ^a	0,22±0,13 ^a	63,0
Caurenol 40	0	0,19±0,08	0,29±0,08 ^a	0,25±0,3 ^a	0,26±0,05 ^a	0,22±0,07 ^a	64,0

Controle – Salina 0,9%; Indometacina 10 mg/kg p.c.; Cop 100, 200 e 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Caurenol 10, 20 e 40 – correspondem as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol; média±DP – média ± desvio padrão; % de redução em 3h; ^{a, b, c} Significativamente diferente do grupo Controle em $P<0,05$; 0,01 e 0,001, respectivamente.

Figura 26 – Efeito das diferentes doses de *C. langsdorffii* e caurenol sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina. 1 h após o tratamento foi administrada a carragenina e o edema foi mensurado por 5 h em intervalos de 1 h.

4.6.6 Ensaio de edema de pata induzido por dextrana

Os dados sobre peso corpóreo obtidos nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na tabela 12. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para essa variável.

Os valores médios e o desvio padrão estão apresentados na tabela 12 e figura 27. O grupo controle apresentou pico do edema em 1 hora, sendo o mesmo usado como base para o cálculo de redução. Uma redução significativa no valor do volume do edema foi observada nos grupos tratados com as diferentes doses de Cop de 100 e 200 mg/kg p.c. e das doses de 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol quando comparados com o grupo controle. As diferentes doses do extrato apresentaram aumento na resposta em relação ao aumento da dose. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa, não mostrando efeito dose-resposta. O caurenol apresentou diferença significativa entre a dose de 10 mg/kg p.c. com relação as doses de 20 e 40 mg/kg p.c., as quais não foram diferentes entre si.

Tabela 12 - Número médio e desvio padrão do volume do edema de pata induzido por dextrana de ratos tratados com as diferentes doses do extrato de *Copaifera langsdorffii* e caurenol

Grupos	Relação do volume do edema em (mL):					% de redução
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	
Controle	0,02±0,05	0,98±0,11	1,25±0,15	1,09±0,13	0,94±0,11	
Dexametasona	0,00±0,05	0,60±0,09 ^a	0,59±0,14 ^a	0,51±0,12 ^a	0,42±0,10 ^a	53,0
Cop 100	-0,01±0,06	0,58±0,10 ^a	0,76±0,13 ^a	0,80±0,09 ^b	0,53±0,10 ^a	39,0
Cop 200	0,00±0,02	0,57±0,09 ^a	0,78±0,19 ^a	0,73±0,14 ^a	0,73±0,13 ^a	37,2
Cop 400	-0,01±0,06	0,92±0,27	1,11±0,32	0,97±0,27	0,97±0,23	10,6
Caurenol 10	0,01±0,04	0,82±0,21	1,13±0,18	1,11±0,23	1,01±0,37	9,4
Caurenol 20	0,00±0,02	0,50±0,12 ^a	0,56±0,06 ^a	0,52±0,16 ^a	0,47±0,17 ^a	55,0
Caurenol 40	0,00±0,03	0,42±0,16 ^a	0,52±0,23 ^a	0,53±0,17 ^a	0,45±0,18 ^a	58,1

Controle – Salina 0,9%; Dexametasona 1mg/kg p.c.; Cop 100, 200, 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Caurenol 10, 20 e 40 – correspondem as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol; % de redução em do volume do edema em 1h; ^{a, b} Significativamente diferente do grupo Controle em $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente

Figura 27 – Efeito das diferentes doses de *C. langsdorffii* e caurenol sobre o volume do edema de pata induzido por dextrana. 1 h após o tratamento foi administrada a dextrana e o edema foi mensurado por 2 h em intervalos de 30 min.

4.6.7 Ensaio de migração celular

Na tabela 13 estão expressos os valores médios e desvio padrão do peso dos animais. Com relação a essa variável não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento.

Na tabela 13 e figura 28 estão expressos os valores da contagem total de células [(cel/mm³)/50], a contagem específica de monócitos, neutrófilos e eusínófilos. Com relação à

contagem total de células o LPS foi capaz de induzir significativamente o total de células em comparação com o controle, sendo que apenas a dexametasona foi capaz de inibir significativamente a indução provocada pelo LPS. Na contagem específica o LPS induziu o aumento de neutrófilos em relação ao número de monócitos. As diferentes doses de *C. langsdorffii* apresentaram redução no número de neutrófilos em relação ao grupo LPS, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa. Devido à ausência de resposta significativa o ensaio não foi usado para testar o composto isolado. O número de eosinófilos não apresentou variação significativa entre os grupos de tratamento indicando ausência de parasitose nos animais.

Tabela 13 - Avaliação da migração celular de camundongos tratados com LPS e/ou diferentes concentrações de *C. langsdorffii*

Grupos	Contagem total	Contagem específica			Peso (mg)
		Monócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	
Controle	23,3±3,7 ^b	93,7±3,3 ^b	5,0±2,0 ^b	1,3±1,5	146,3±22,6
LPS	115,5±31,0 ^a	36,2±12,7 ^a	62,7±12,5 ^a	1,0±0,6	161,5±41,3
Dexametasona+LPS	38,2±16,6 ^b	62,5±10,9 ^{a,b}	35,7±10,6 ^{a,b}	1,7±0,5	123,0±9,0
Cop 100+LPS	117,2±23,9 ^a	51,5±17,9 ^a	48,2±18,4 ^a	0,7±0,5	157,0±14,5
Cop 200+LPS	91,0±18,6 ^a	52,2±7,1 ^a	47,7±6,7 ^a	0,7±0,8	159,8±8,8
Cop 400+LPS	113,7±33,6 ^a	48,2±23,0 ^a	50,5±23,1 ^a	1,3±1,0	162,0±30,1

Controle – Salina 0,9%; LPS – lipopolissacarídeo 100 ng/animal; Dexametasona 1mg/kg p.c.; Cop 100, 200, 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; ^a Significativamente diferente do grupo Controle em $P<0,01$; ^b Significativamente diferente do grupo LPS em $P<0,01$

Figura 28 - Número de células obtidos da lavagem peritoneal de camundongos. 1 h antes da injeção intraperitoneal de LPS os animais foram tratados com as diferentes doses do extrato e 4 h após LPS foram eutanasiados e a cavidade abdominal foi lavada para contagem celular.

4.6.8 Ensaio de motilidade intestinal

Os dados sobre peso corpóreo obtidos nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na tabela 14. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para essa variável.

Na tabela 14 e figura 29 estão expressos os valores médios e desvio padrão do trânsito intestinal. As três doses de Cop reduziram significativamente o trânsito intestinal quando comparado ao grupo controle, indicando atividade antiespasmódica do extrato. O caurenol não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, não apresentando atividade nas diferentes doses testadas. Atropina reduziu significativamente o trânsito intestinal quando comparado ao grupo controle, mostrando a eficiência do sistema teste.

Tabela 14 - Avaliação da motilidade tratointestinal com carvão ativo em camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii* e caurenol

Tratamentos	Intestino (cm)	Deslocamento do carvão ativo (cm)	Transito intestinal (%)	Peso (mg)	% de redução
Controle	40,83±5,91	30,25±4,90	73,97±2,85	30,17±1,17	-
Atropina	39,67±3,08	14,83±5,74	37,28±13,57 ***	27,83±1,47	50,21
Cop 100	41,17±1,17	22,00±5,40	53,53±13,34 ***	30,33±2,07	28,50
Cop 200	40,83±1,47	25,33±1,03	62,06±1,85 *	27,50±1,05	20,87
Cop 400	35,50±3,08	20,17±2,71	56,68±4,28 **	27,83±2,79	24,29
Caurenol 10	38,67±1,97	24,50±1,52	63,35±1,87	27,67±1,63	15,38
Caurenol 20	36,50±1,38	24,00±2,19	65,83±6,5	27,33±1,63	12,08
Caurenol 40	38,00±2,90	24,33±2,42	64,10±5,07	27,50±1,87	14,39

Controle – Salina 0,9%; Atropina 2,5 mg/kg p.c.(intraperitoneal); Cop 100, 200, 400 – correspondem as doses de 100, 200 e 400 mg/kg p.c do extrato de *C. langsdorffii*; Caurenol 10, 20 e 40 – correspondem as doses de 10, 20 e 40 mg/kg p.c. de caurenol; *Significantemente diferente do grupo controle em $P<0,05$ *, 0,01** e 0,001***

Figura 29 - Avaliação do transito intestinal com carvão ativo em camundongos tratados com extrato de *C. langsdorffii* e caurenol. Os animais foram tratados 1 h antes da administração do carvão e foram eutanasiados 30 min após o carvão para mensuração do transito intestinal.

4.6.9 Citotoxicidade *in vitro*

A viabilidade celular avaliada por ensaio de MTT foi usada para avaliar a toxicidade de Cop e caurenol (Fig. 30). As concentrações de Cop (30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$), caurenol (1, 3 e 9 mg/mL), LPS e Cop e caurenol associados com LPS não afetou a viabilidade celular quando comparados com células não estimuladas (Ctr), porém a concentração de 27 $\mu\text{g/mL}$ de caurenol associado ou não com LPS mostrou significante citotoxicidade. Com base nestes resultados as concentrações utilizadas nos ensaios seguintes foram de 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$ e 1, 3 e 9 mg/mL de caurenol.

Figura 30 – Viabilidade celular em relação ao grupo controle (Ctr) obtida pelo ensaio de MTT de Cop e caurenol. Células aderentes foram estimuladas com Cop (30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$) ou caurenol (1, 3, 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$) e a viabilidade foi analisada 24 h após a incubação. No outro grupo, as células aderentes foram pré-estimuladas com LPS (0,4 $\mu\text{g/mL}$) e Cop e caurenol foram adicionados após 2 h. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. *** $P < 0,001$ significativamente diferente do controle (Ctr).

4.6.10 Avaliação de NO e citocinas

Na ausência de LPS, Cop e caurenol, em todas as concentrações, não induziu mudança significativa na produção de NO em comparação com o controle. Na presença de LPS, em todas as concentrações, Cop inibiu de forma dose-dependente a produção de NO ($P < 0,001$) em comparação com LPS sozinho. Além disso, caurenol inibiu a produção de NO em todas as concentrações testadas em comparação com LPS sozinho (Fig. 31). Considerando-se que Cop e caurenol foram capazes de reduzir a produção de NO, foi investigada as suas capacidades de modularem a produção de citocinas pró-e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-10) por macrófagos.

Figura 31 A, B - Efeito do extrato de *C. langsdorffii* e caurenol na produção de NO na ausência e presença de LPS. Células aderentes foram estimuladas com Cop (30, 60 e 120 µg/mL; A) ou caurenol (1, 3 e 9 µg/mL; B) e os sobrenadantes coletados 24 h após a incubação. No outro grupo, as células aderentes foram pré-estimuladas com LPS (0,4 µg/mL), sendo que Cop e caurenol foram adicionados após 2 h. Os sobrenadantes foram coletados após 24 h. A quantidade de NO presente no sobrenadante foi determinado pela reação de Griess. Os resultados são expressos como média±DP de dois experimentos independentes. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado com LPS.

Cop nas concentrações de 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$ estimulou a produção de $\text{TNF-}\alpha$ na ausência de LPS. Em todas as concentrações Cop e caurenol não reduziram a estimulação induzida por LPS de $\text{TNF-}\alpha$. Cop e caurenol não modularam a produção de IL-6 e IL-10 associada ou não a LPS em todas as concentrações (Fig 32).

Figura 32 - Efeito do extrato de *C. langsdorffii* e caurenol na modulação de $\text{TNF-}\alpha$ (A), IL-10 (B) e IL-6 (C). As células aderentes foram estimuladas com Cop (30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$) e caurenol (1, 3 e 9 $\mu\text{g/mL}$) duas horas após a estimulação com LPS. O sobrenadante foi coletado 24 h após a estimulação com LPS. Os resultados são expressos em média $\pm$ DP. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o controle.

5 Discussão

Trabalhos publicados recentemente têm reportado que o extrato das folhas de *C. langsdorffii* é capaz de inibir a formação de micronúcleos induzidos por doxorubicina em camundongos mostrando atividade antimutagênica (Alves et al., 2012) e apresenta atividade antitumoral contra lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos induzidas por dimetilhidrazina (Senedese, 2013). Além disso, o extrato apresentou atividade antiurolitisiática em ratos (Brancaion et al., 2012). Contudo, é muito importante destacar que há pouquíssimos estudos em relação à composição química e as atividades biológicas de extratos das partes aéreas de espécies de Copaifera. Nesse sentido, no presente trabalho se propôs estudar o perfil dos metabólitos secundários das folhas de *C. langsdorffii*, fazer a biotransformação de um composto isolado após epoxidação, bem como realizar ensaios analgésicos e anti-inflamatórios.

Para o estudo do perfil metabólico de *C. langsdorffii* foram usadas diferentes técnicas cromatográficas como o CCC e permeação em gel sephadex. Devido o CCC utilizar sistemas de solventes imiscíveis como fase móvel e fase estacionária e ser o sistema bifásico que define como a separação ocorrerá, a escolha do sistema de solventes é chave para o sucesso no uso do CCC. Dados da literatura sugerem inúmeras alternativas para se iniciar a escolha do sistema de solventes apropriado à amostra a ser utilizada (Pauli et al., 2008; Seger et al., 2006 e Ito, 2005). No presente estudo o sistema de solventes foi bifásico com o uso de quatro solventes, o que está de acordo com a literatura que diz que o sistema deve ser preferencialmente bifásico contendo entre três a cinco solventes, podendo, em alguns casos, ser trifásico. Além disso, após completa solubilização da amostra o tempo de decantação foi de 25 s ficando dentro dos padrões citados pela literatura onde é dito que para uma boa resolução a amostra deve ser estável e solúvel no sistema e o tempo de decantação das fases após agitação deve ser inferior a 30 s, pois isso tem uma estreita relação com a retenção da fase estacionária na coluna de CCC. A proporção do volume da fase móvel e estacionária para o sistema de solventes desenvolvido para o fracionamento por CCC foi de 2,2 : 1,2 (fase orgânica : fase aquosa). Embora a proporção 1:1 dos volumes das duas fases seja desejável, tendo em vista a economia de solventes, a proporção obtida utilizando método de eluição normal, possibilitou o consumo total da fase móvel para o volume de fase estacionária. Estudos realizados por Leitão et al., (2005) em HSCCC no modo reverso, resultaram na separação de flavonóides livres e glicosilados, sendo alguns deles de estruturas químicas muito semelhantes, porém dificilmente separáveis por CLAE.

Um fator importante é o coeficiente de partição (K) que é a relação de soluto distribuído entre as duas fases do sistema de solventes em equilíbrio e geralmente é expresso pela quantidade de soluto na fase estacionária dividido pela quantidade de soluto na fase móvel (Ito, 2005), ou pela quantidade de soluto na fase móvel dividido pela quantidade de soluto na fase estacionária. No presente trabalho os coeficientes de partição e de separação de quercitrina e afzelina permaneceram na faixa ideal, garantindo o isolamento das mesmas, pois a separação de diferentes compostos em frações que contenham um composto puro ou semi-puro é dependente da relação entre os valores do K . De acordo com a literatura o K das substâncias deve estar na faixa de $0,5 < K < 2,0$ e o fator de separação ($\alpha = K_2/K_1$, $K_2 > K_1$) entre duas substâncias deve ser superior a 1,5 para garantir separação eficiente (Costa, 2009; Marston e Hostettmann, 2006; Ito, 2005).

O rendimento dos compostos isolados por CCC pode ser maior se a etapa em CLAE-preparativo não for necessária. Na tentativa de evitar a perda no processo do isolamento dos flavonóides da fração em acetato de etila em CLAE, as frações 15-23 e 34-41 foram fracionadas por CCC na coluna de 107 mL usando a mesma fase móvel. Contudo, a pureza ficou em torno de 90%. Por meio da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN e da comparação com dados da literatura (Nugroho et al., 2009; Puri, et al., 1994) foi possível concluir que o composto **1** corresponde à quercitrina e o composto **2** corresponde a afzelina, ambos já isolados em estudos prévios para desenvolvimento e validação de método de quantificação em extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP (Souza, 2011). Contudo, o isolamento por cromatografia contracorrente proporcionou maior rendimento, sendo de 4,4 e 6,3 vezes maior para quercitrina e afzelina, respectivamente. Além disso, o maior rendimento usando o HSCCC possibilitou o uso desses compostos para realização de ensaios biológicos.

A cromatografia de filtração em gel utilizando gel de Sephadex-LH 20 para obtenção de frações ricas em compostos polares combinada com CLAE-PREP em fase reversa tem sido utilizada para o isolamento de compostos polares (Macías et al., 1999). Utilizando-se dessa técnica, no presente trabalho foram isolados dois compostos que tiveram suas estruturas determinadas. Além disso, Macías et al. (1999) isolaram quatorze flavonóides, uma lignana, uma cumarina e três compostos fenólicos utilizando-se desta estratégia. Segundo Berlinck (1994), Sephadex LH-20 é um modelo preferível de fase estacionária inerte, sendo amplamente utilizada para separação de compostos de alta polaridade e/ou instáveis. Trabalhos na literatura também

descrevem o uso de Sephadex LH-20 para separação de compostos polares como fenólicos (Gobbo-Neto et al., 2008) e diferentes tipos de flavonóides (Andersen e Markham, 2006), bem como outros tipos de géis de filtração como BIO-GEL P2, CM-Sephadex C-25 e géis japoneses Tyopearl (Berlinck, 1994). No entanto, outras fases estacionárias não inertes também têm sido utilizadas em colunas abertas nas primeiras etapas de purificação de extratos e/ou frações polares de produtos naturais tais como: resinas de troca iônica (Durham, 2006; Berlinck, 1994) e resinas de absorção do tipo Amberlite XAD-2 (Gobbo-Neto et al., 2005). Na cromatografia em gel de sephadex a separação ocorre predominantemente pela exclusão de tamanho das moléculas. Sendo assim, as frações obtidas não foram diferenciadas em relação à polaridade maior ou menor dos compostos; e, portanto, houve a necessidade de desenvolver um único método em CLAE-preparativo que fosse capaz de resolver os picos de todas as frações.

Os compostos isolados em gel sephadex ácido 4',4''-dimetóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico e ácido 4(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico pertencem aos derivados do ácido galoilquínico (DAGQ). O núcleo principal dos DAGQ é o ácido quinico, que apresenta grupos hidroxílicos nas posições C-1, C-3, C-4 e C-5, os quais podem ser esterificados por uma ou mais unidades de ácido gálico. Essas podem estar esterificadas com um ou mais resíduos de ácido gálico. Como diversas estruturas podem ser formadas, encontra-se uma grande similaridade estrutural e, portanto, pequenas variações nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamento são os principais pontos de diferenciação destes constituintes para identificação e elucidação estrutural por espectroscopia de RMN (Parker et al., 1989; Ishimaru et al., 1987). Absorções máximas no espectro de UV em torno de 230 nm e em torno de 276 nm podem sugerir a presença dos DAGQ. No entanto, as análises espectroscópicas de RMN (Hou et al., 2000; Parker et al., 1989) e espectrométricas (He Zhyong et al., 2009; Sannomiya et al., 2005) têm sido utilizadas na identificação e elucidação estrutural desses derivados.

Com o objetivo de se determinar uma possível via de metabolização e a obtenção de derivados mais bioativos o ácido caurenóico foi epoxidado e submetido a biotransformação. De acordo com Chang e colaboradores (2006) a biotransformação de derivados de *ent*-cauranos por vários micro-organismos tem sido reportada, sendo como principais objetivos a melhora das atividades biológicas, o estudo da metabolização destes por micro-organismos e estudos biossintéticos. Nesse sentido, foi realizada a biotransformação de **7** que conduziu para a obtenção de um composto até então desconhecido e mais quatro produtos, os quais sofreram formação de

ligação dupla, hidroxilações e desidroxilações. Estes dados são condizentes, pois micro-organismos têm provado serem efetivos na introdução de grupos hidroxílicos em seletivas posições, especialmente em sítios inativos tais como a porção de hidrocarbonetos de moléculas orgânicas (Holland e Weber, 2000). Além disso, é reportado a biotransformação do epóxido de ácido caurenóico resultando no ácido 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-oico e A₁₂-7-aldeído 16 α ,17-diidroxigiberelin por *Gibberella fujikuroi* (Fraga et al., 1994). Outro fato observado foi a formação somente o diol α como produto de biotransformação, contudo esses dados condizem com a literatura, pois sabe-se que na hidrólise do epóxido, micro-organismos são capazes de abrir o epóxido de forma estéreo-seletiva que dão origem a dióis opticamente puros (Swaving e Bont, 1998).

Para a avaliação das atividades biológicas do extrato de *C. langsdorffii* e compostos isolados foram usados ensaios de avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória e devido a variedade de agents químicos que tem atividade anti-inflamatória associada com a complexidade do processo inflamatório que envolve ativação de enzima, liberação de mediadores, extravasão de fluidos, migração celular, quebra de tecido e reparo (Vane e Bolting, 1995) foi essencial o uso de diferentes modelos experimentais.

De acordo com Besson (1997), a inflamação aguda ou crônica é um modelo de nocicepção e pesquisas sobre dor inflamatória têm mostrado que mediadores inflamatórios podem gerar impulsos nociceptivos. Descobertas apontam a contribuição de citocinas na geração e manutenção da hiperalgesia que acompanha a dor neuropática (Jungler e Sorkin, 2000). Assim, o uso de fármacos anti-inflamatórios resulta em alívio da dor.

Considerando o fato de que agentes anti-inflamatórios podem apresentar atividade analgésica, foram escolhidos ensaios que pudessem determinar a atividade analgésica em nível de sistema nervoso, por diminuição da inflamação e ação anti-inflamatória.

O extrato de *C. langsdorffii*, bem como os compostos isolados quercitrina, afzelina e caurenol foram submetidos à avaliação da interferência destes na atividade locomotora dos animais (campo aberto) e a avaliação da toxicidade aguda. O ensaio de campo aberto foi usado para avaliar os efeitos de fármacos no comportamento dos animais (Diana e Sagratella, 1994). Este ensaio foi importante para que se pudesse excluir a possibilidade de que a atividade biológica estesse relacionada a distúrbios não específicos na atividade locomotora dos animais (ação central). No ensaio de campo aberto as amostras testadas não apresentaram alterações na

atividade locomotora e na avaliação da toxicidade aguda não foram observadas alterações comportamentais e/ou fisiológicas como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, letargia e agressividade), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, piloereção e mortalidade (Lapa et al, 2008) nas doses testadas, excluindo um possível efeito sedativo ou distúrbio motor induzido pelas amostras testadas, tornando-as adequadas para as avaliações posteriores.

Como primeiro teste para avaliação de atividade analgésica e anti-inflamatória foi escolhido o teste de contorções abdominais induzido por ácido acético, pois ele é um método simples, econômico, sensível e reprodutível, tornando-o indicado para a triagem de analgésicos narcóticos e não narcóticos (Willianson et al., 1996) e consiste na injeção intraperitoneal de um agente nociceptivo (estímulo químico que induz a dor). Quando foi injetada a solução de ácido acético intraperitonealmente nos camundongos foi manifestada uma síndrome caracterizada por contorções intermitentes do abdômen, torção do tronco e extensão das patas traseiras (Koster et al., 1959). Embora este seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, este possibilita avaliar em um primeiro momento a atividade analgésica de várias substâncias que atuam tanto ao nível central quanto periférico (Baggio, et al., 2002). Por essa razão no presente estudo foram testadas diferentes doses do extrato, frações e compostos isolados. As doses de Cop e as frações em hexano, em diclorometano e em acetato de etila apresentaram atividade significativa sobre o processo hiperalgésico desencadeado pela aplicação de ácido acético, indicando que a atividade do extrato pode ser atribuída aos compostos presentes nessas frações e o caurenol apresentou atividade significativa nas doses de 20 e 40 mg/kg p.c, indicando que o caurenol é um dos compostos responsáveis pela atividade do extrato e que ele pode ter atividade sobre canais de cátions ou mediadores químicos. De acordo com a literatura os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátion não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias (Julius e Basbaum, 2001). Além disso, ocorre lesão tecidual e liberação de mediadores da inflamação como prostaglandinas, bradicininas, TNF- α , IL-1 β e IL-8, responsáveis pela indução do estímulo nociceptivo que pode ser bloqueado por anestésicos locais e substâncias analgésicas (Garcia-González et al., 2000; Collier et al., 1968).

Esses resultados são corroborados por Paiva e colaboradores 2004 o óleo resina de *C. langsdorffii* previne danos no tecido induzidos por ácido acético. Eles sugerem que a atividade pode estar relacionada com sua capacidade antioxidante e antilipoperoxidativa. Esses resultados

são confirmados por Gomes et al., (2007), os quais mostraram que o óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayane e *Copaifera reticulata* Ducke apresenta atividade antinociceptiva de forma periférica e central.

Os compostos quercitrina e afzelina não apresentaram atividade no teste de contorções abdominais na dose de 100 mg/kg p.c. Por essa razão quercitrina e afzelina não foram usados nos ensaios posteriores, sendo somente o caurenol testado nos ensaios em que o extrato apresentou atividade. Esses resultados condizem com a literatura, pois de acordo com a literatura os compostos quercetina e canferol mostraram inibir a liberação das interleucinas 6 e 8, TNF- α , histamina e triptase demonstrando atividade anti-inflamatória (Kempuraj et al., 2005). No presente trabalho a ausência de atividade anti-inflamatória pode ser atribuída com a glicosilação dos mesmos, o que está de acordo com Brown e Dietrich (1979) que mostraram que quercetina e canferol apresentam mutagenicidade no ensaio de microsome em *Salmonella/mammalian* TA98. Contudo, quando glicosilados, quercetina-3-*O*-ramnosídeo e canferol-3-*O*-galactose-ramnose-7-*O*-ramnosídeo, perderam atividade.

Como o teste de contorções abdominais é usado para triagem de drogas analgésicas e anti-inflamatórias de forma não específica, o teste formalina foi escolhido por permite avaliar como um animal responde a dor contínua e moderada causada por injúria tecidual, fornecendo um modelo de dor clínica mais válido do que aqueles com estímulo físico, térmico ou mecânico e, principalmente, por apresentar duas fases distintas comportamento nociceptivo (Rosland et al., 1990). Para este ensaio foram testadas as doses de 100, 200 e 400 mg/kg de Cop, contudo não foi testada a dose de 50 mg/kg, pois em ensaios preliminares ela não mostrou atividade. Tanto as diferentes doses de Cop e caurenol não apresentaram atividade na primeira fase nos primeiros cinco minutos após a injeção de formalina que é caracterizada como fase de dor neurogênica que resulta de direta estimulação química de nociceptores, o que indica que eles não têm atividade no nível de sistema nervoso central (Rosland et al., 1990). Além disso, esse resultado é corroborado pelo uso do analgésico narcótico morfina como controle referência que inibiu ambas as fases, pois é uma droga com atividade analgésica central. Já na segunda fase do ensaio que ocorre de 15 a 30 minutos após o estímulo (Rosland et al., 1990), Cop e caurenol significativamente reduziram o tempo de lambida de pata. Assim, esses resultados indicam que a atividade dos mesmos esteja associada à diminuição da dor provocada pelo processo inflamatório, pois na segunda fase deste ensaio a dor depende do processo inflamatório periférico e alterações no processamento central

(Rosland et al., 1990). Além disso, a observação de que Cop e caurenol apresentaram resposta semelhante ao composto referência não esteroideal indometacina que foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo durante a segunda fase é um indicativo de que essas amostras possam apresentar o mesmo mecanismo de ação que a indometacina, a qual é capaz de inibir a produção de prostaglandinas via inibição da enzima COX (Rosland et al., 1990).

Para se confirmar a ausência de atividade analgésica no nível de sistema nervoso central foi usado o ensaio de placa quente, o qual é caracterizado por um estímulo de curta duração e alta intensidade que é detectado por terminações nervosas livres e transmitido por vias neurais de condução que envolve funções cerebrais superiores e consiste em resposta ao estímulo nociceptivo a nível supra-espinal (Gardmark et al., 1998). A morfina usada como composto de referência apresentou efeito analgésico durante todo o ensaio e Cop mostrou não ser capaz de aumentar o tempo de resposta do animal ao estímulo, indicando que o mesmo não apresenta atividade em nível de sistema nervoso central e periférico, corroborando com os resultados observados na primeira fase do ensaio de formalina.

Com o objetivo de se confirmar a atividade anti-inflamatória observada na segunda fase do teste de formalina, o teste do edema de pata de rato induzido por carragenina foi escolhido por ser o modelo mais utilizado para avaliar efeito anti-inflamatório de amostras, uma vez que não produz efeitos sistêmicos, não apresenta potencial antigênico, possui elevado grau de reprodutibilidade e sua ação inflamatória pode ser inibida por agentes anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (Winter et al., 1962). A carragenina foi escolhida como agente indutor de inflamação por ser um polissacarídeo sulfatado extraído de algas que induz resposta inflamatória local mensurável que é caracterizada por três fases distintas. Na primeira fase (0-90 min) ocorre a liberação de histamina e serotonina, contudo no presente estudo, as doses de Cop e caurenol não apresentaram atividade significativa na primeira hora indicando que eles não foram capazes de inibir a liberação desses mediadores. Além disso, de acordo com Di Rosa e colaboradores (1971) histamina e 5-hidrotriptamina são as principais responsáveis pela ocorrência de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na fase inicial do processo inflamatório. A segunda fase (90-150 min) é mediada pela liberação de cininas, como a bradicinina e a fase terminal (>150 min) está associada com a liberação de prostaglandinas e NO. As diferentes doses de Cop e caurenol inibiram significativamente o edema por carragenina nos tempos de 2, 3, 4 e 5 h com pico máximo do edema em 3 horas. A atividade das amostras no

tempo de 2 h foi associada às cininas, pois o envolvimento de bradicinina nas reações inflamatórias agudas e sua capacidade de induzir o aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos foram relacionados com o edema induzido por carragenina em pata de rato (Ronald e Christopher, 1990). Como as amostras apresentaram atividades nos tempos entre 3 e 5 h a atividade foi associada a inibição de porstaglandinas via inibição da COX e inibição de NO. De acordo com Di Rosa e Willoughby (1971) a infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares foi observada na terceira fase do edema induzido por carragenina o que indica que a inibição da infiltração de leucócitos polimorfonucleares possa ser um dos mecanismos de ação. Além disso, outro mecanismo pode ser sobre o sistema complemento, pois todos esses mediadores mostram ser dependentes do sistema complemento para o exercício de sua atividade.

Na busca do mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória observada nos ensaios anteriores foi realizado o ensaio de edema de pata induzido por dextrana, pois ela é um polissacarídeo de alto peso molecular que induz reação anafilática após a injeção em extremidades de ratos e camundongos, a qual é caracterizada pela extravasão de fluidos e formação de edema, como consequência da ativação de mastócitos e liberação de aminas biologicamente ativas. A atividade de Cop e caurenol no edema induzido por dextrana pode ser atribuído à inibição da extravasão e do edema. Além disso, um anti-histamínico seletivo, o qual não possui atividade antiserotonina, não inibiu a permeabilidade vascular induzida por dextrana, mostrando que a histamina não tem participação nesse tipo de reação inflamatória (Stokbroeckx et al., 1986) e Van Wauve e Goosens (1989) mostraram que a inflamação provocada por dextrana foi suprimida por antagonistas de 5-HT-serotonina e inibidores de lipoxigenase, o que implica serotonina, ácidos (per)hidroxieicosatetraenoico, leucotrienos, cininas como agentes mediadores. Nesse sentido, a ausência da atividade de Cop e caurenol no edema de pata de rato induzido por carragenina na primeira hora em comparação com a atividade em dextrana pode ser atribuída a participação da histamina na primeira hora do edema induzido por carragenina.

Para verificar se a atividade anti-inflamatória estava envolvida com a inibição da migração celular foi realizado o ensaio de migração celular que consiste na injeção intraperitoneal de um agente capaz de induzir a migração de neutrófilos. Como agente indutor foi usado o LPS, pois de acordo com Souza et al. (2004) a injeção de 100 ng por cavidade de LPS apresenta pico de indução em 4 horas, sendo que doses maiores não provocam aumento adicional do influxo de neutrófilos. O LPS é um constituinte da parede celular de bactérias que é capaz de

ativar o sistema de cininas, o sistema complemento e estimula a resposta imune inata. Cininas são responsáveis por muitos sinais e sintomas da resposta inflamatória incluindo a migração de leucócitos via estimulação de receptores de membrana G, chamados B₁ e B₂. Assim, antagonistas de B₁ e B₂ podem bloquear as ações biológicas das cininas (Cabrini et al., 2001; Saleh et al., 1997). No presente estudo, o composto dexametasona foi capaz de reduzir o influxo de neutrófilos, contudo Cop apresentou pequena redução do influxo, contudo a mesma não foi significativa, indicando que o extrato não foi capaz de inibir a síntese proteica como a dexametasona que pertence à classe dos corticosteroides ou atividade antagonista de B₁ e B₂.

O ensaio de motilidade intestinal foi realizado para avaliar a atividade das amostras sobre musculatura lisa. O mesmo foi escolhido por ser um ensaio simples, se o uso de instrumentos específicos e usado como um ensaio preliminar. Este ensaio consistiu em determinar a velocidade do trânsito do carvão ativado após um período pré-determinado da sua administração sob a ação das amostras avaliadas. As três concentrações de Cop reduziram significativamente o deslocamento do carvão ativo, indicando atividade antiespasmódica. Porém, o composto caurenol não apresentou atividade. Ambrosio et al. (2004) estudaram o papel do grupo carboxílico na atividade antiespasmódica e vasorrelaxante do ácido caurenóico em comparação com o derivado éster metílico. Eles concluíram que a modificação estrutural no C-19 do grupo carboxílico reduz a atividade antiespasmódica em anéis aórticos de roedores. Apesar da atividade do extrato não foram realizados mais ensaios sobre a musculatura lisa, pois o extrato apresentou atividade inferior ao composto referência.

Para colaborar com os resultados *in vivo* foram realizados ensaios *in vitro* para a dosagem de NO, TNF- α , IL-10 e IL-6. Como concentrações citotóxicas podem gerar resposta falso positivo foi realizado o ensaio de MTT garantindo a viabilidade das células e a eficiência do ensaio.

A dosagem de NO foi realizada porque de acordo com Repetto e Llesuy (2002) espécies reativas de oxigênio participação da etiologia e fisiopatologia de doenças humanas como desordens neurodegenerativas, inflamações, infecções virais, doenças autoimunes e distúrbios do sistema digestivo. Em muitas reações enzimáticas e de auto-oxidação o corpo produz radicais superóxidos. Células fagocitárias como neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos geram superóxidos, como parte de sua resposta a um organismo estranho. Em inflamações crônicas esse mecanismo normal de proteção pode provocar danos ao tecido (Anderson e Phillips, 1999).

Assim, a proteção conferida por compostos naturais com atividade antioxidante podem amenizar algumas fisiopatologias como processos inflamatórios.

No presente estudo Cop e caurenol não induziram a liberação de NO, mas em todas as concentrações significativamente reduziram a liberação de NO induzida por LPS. Esses resultados são relevantes porque NO é uma molécula efetora sintetizada a partir do aminoácido L-arginina e pode ser liberado em resposta a estimulação física e de receptores e a ativação de diferentes tipos celulares. Quando produzido em pequenas quantidades apresenta funções regulatórias e contribui para a manutenção da integridade e funções da membrana, mas em grandes quantidades desempenha atividade citotóxica contra micro-organismos e, isto, tem efeito sobre a resposta inflamatória como um importante vasodilatador e antiagregante (Moncada et al., 1991). Assim, a inibição de NO é um dos mecanismos da atividade antiedematogênica observada nos ensaios *in vivo* para extrato e o caurenol.

A capacidade de espécies de *Copaifera* de inibir a liberação de NO já tinha sido observada por Veiga e colaboradores em 2007, contudo essa atividade foi observada para os óleos de *C. multijuga* Hayne, *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke que mostraram atividade anti-inflamatória inibindo a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos e a acumulação de neutrófilos e leucócitos, contudo é importante ressaltar que esse é o primeiro relato dessa atividade associada às folhas de *C. langsdorffii*. Além disso, de acordo com Fernandes e colaboradores (1992) o óleo de *C. langsdorffii* foi capaz de inibir edema de pata em espécies de roedores e a administração do óleo resina de *C. langsdorffii* mostrou significativa proteção contra danos gástricos provocados por etanol e preveniu ulceração gástrica induzida por indometacina (Paiva et al., 1998).

Apesar do extrato não ter inibido a migração celular, os ensaios de dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizados porque a produção de citocinas é uma parte integral para a avaliação da resposta imune, sendo que as citocinas podem ser divididas em dois grupos: pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) (Schiepers et al., 2005). No presente estudo foi avaliada a atividade inflamatória e anti-inflamatória de Cop e caurenol. Eles significativamente induziram a produção de TNF- α na ausência de LPS e quando associado à LPS elas não modularam a indução de TNF- α . Assim, esses resultados corroboram com os obtidos no ensaio de migração celular, pois a principal função do TNF- α é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos. Por outro lado, Cop e caurenol não modularam

da produção de IL-6 e IL-10. Com relação ao fato de que IL-6 é secretado por macrófagos e estimula a produção de neutrófilos, a não inibição dela, juntamente com a não estimulação de IL-10, que é um inibidor de macrófagos, provavelmente, também, conduz para um aumento da migração celular.

Caurenol mostrou ser um dos compostos responsáveis pela atividade antiedematogênica do extrato. Essa atividade também foi associada ao ácido caurenóico, o qual também foi isolado do extrato das folhas. De acordo com Paiva e colaboradores (2003) o ácido caurenóico que é um diterpeno isolado do óleo-resina de *C. langsdorffii* foi capaz de reduzir a colite induzida por ácido acético em ratos diminuindo a infiltração de células inflamatórias (Paiva et al., 2003) Além disso, Lim e colaboradores (2009) demonstraram que o ácido caurenóico é capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina em camundongos, sendo que o mesmo apresentou efeito dose resposta e redução do edema de 71% na dose de 100 mg/kg p.c.. Esses resultados também foram confirmados por Chavan e colaboradores (2011) que demonstraram a atividade analgésica e anti-inflamatória do ácido caurenóico pelos ensaios de contorção induzida por ácido acético, placa quente e edema de orelha nas doses de 10 e 20 mg/kg p.c. Contudo, de acordo com Cavalcanti e colaboradores (2006) o ácido caurenóico mostrou ser genotóxico pelo ensaio do cometa e mutagênico pelo ensaio de micronúcleo em células V79 nas concentrações de 30 e 60 µg/mL e, posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o ácido caurenóico foi genotóxico *in vitro* e *in vivo* em linhagens de células tumorais e mutagênico em leveduras, provavelmente devido a geração de quebras de fita dupla no DNA e/ou inibição de topoisomerase I (Cavalcanti et al., 2010). Nesse sentido, o caurenol e o ácido caurenóico mostraram serem compostos bioativos, contudo o caurenol mostrou ser genotóxico e mutagênico enquanto que o caurenol, de acordo com Hueso-Falcón e colaboradores (2011), não foi citotóxico nem capaz de inibir a produção de óxido nítrico.

6 Conclusões

No presente trabalho é reportado o estudo fitoquímico do extrato das folhas de *C. Langsdroffii* com o isolamento dos compostos quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo, canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo, ácido 4',4''-dimetóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico, o ácido 4-(4''-metóxi galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido caurenóico e caurenol. Além disso, é importante ressaltar que o estudo da composição química pode proporcionar o uso seguro desta planta pela população e que das diferentes modalidades cromatográficas utilizadas no isolamento dos heterosídeos de flavonóides, a cromatografia contracorrente de alta velocidade foi uma ferramenta muito útil e deve ser mais bem explorada no isolamento de metabólitos de plantas, uma vez que propiciou o isolamento de quercitrina, afzelina com bom rendimento.

A biotransformação do epóxido do ácido caurenóico levou a produção do composto até então desconhecido ácido 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico e os compostos ácido 7 α ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico, ácido 7 β ,17-diidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico, ácido 9 β ,16 α ,17-triidroxi-*ent*-cauran-19-oico e ácido 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico. Todavia, suas atividades biológicas não foram avaliadas devido à massa insuficiente obtida de cada composto.

O tratamento oral de animais com Cop e caurenol reduziu a inflamação induzida por diferentes agentes químicos como ácido acético, formalina, carragenina e dextrana. De acordo com a literatura, o ácido caurenóico apresentou atividade anti-inflamatória, contudo mostrou ser genotóxico e mutagênico. Por outro lado, o caurenol não é citotóxico nas concentrações testadas e mostrou ser um dos compostos envolvidos na atividade antiedematogênica do extrato. Todavia, quercitrina e afzelina não estão envolvidas na atividade. Cop e caurenol não afetaram a atividade motora, a primeira fase do ensaio de formalina, o tempo de latência do ensaio de placa quente e a migração celular, significando que Cop e caurenol não têm atividade analgésica central.

A atividade antiedematogênica de Cop e caurenol foram associadas com a regulação da liberação de NO e provavelmente a regulação de mediadores como a serotonina na permeabilidade vascular e de prostaglandinas. Porém, esta atividade não foi associada com o influxo celular e a regulação de TNF- α , IL-6 e IL-10. Assim, esses resultados indicam que Cop e caurenol podem ser usados para o tratamento de desordens inflamatórias.

Os resultados obtidos acrescentam informações importantes ao conhecimento do gênero *Copaifera*, especialmente das partes aéreas de *C. langsdroffii* e contribuíram significativamente para o desenvolvimento do projeto temático FAPESP 2011/13630-7.

Referências bibliográficas

- Alves JM, Munari CC, Monteiro Neto MAB, Furtado AR, Senedese JM, Bastos JK, Tavares DC. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hidroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology** published online, 2012.
- Ambrosio SR, Tirapelli CR, Coutinho ST, de Oliveira DCR, de Oliveira AM, Da Costa FB. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 56, 1407-1413, 2004.
- Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. **Flórida: Taylor & Francis**, 1212 p., 2006.
- Anderson D, Phillips BJ. Comparative In Vitro and In Vivo Effects of Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology** 37, 1015-1025, 1999.
- Andrade Jr MA, Ferraz IDK, Veiga Junior VF. 51º Congresso Nacional de Botânica da Sociedade Botânica do Brasil, Brasília, Brasil, 2000.
- Andrade SF, Cardoso LGV, Carvalho JCT, Bastos JK. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology** 109, 464–471, 2007.
- Antoni S. Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases** 17, 645-54, 2011.
- Baggio MM, Lima MEL, Veasey EA, Haraguchi M. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) **Pers. Arquivos do Instituto Biológico** 69, 49-53, 2002.
- Barbosa JM, Aguiar IB, Santos SRG. 2º Congresso Nacional de Essências Nativas, Brasília, Brasil, 1992.
- Batista R, Humberto JL, Chiari E, de Oliveira AB. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 15, 381–391, 2007.
- Berlinck RGS. Chromatographic Approach to Polar Compounds: Isolation Of The Hydrophylic Constituents Of The Marine Sponge *Crambe*. **Química Nova** 17, 167-171, 1994.
- Besson JM. The complexity of physiopharmacology aspects of pain. **Drugs** 53, 1-9, 1997.
- Besson JM. The neurobiology of pain. **Lancet** 353:1610-1615, 1999.

- Botham PA. Acute systemic toxicity - prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro** 18, 227–230, 2004.
- Braga WF, Rezende CM, Antunes AC, Pinto AC. Terpenoids from *Copaiba cearensis* of *Copaifera* species. **Phytochemistry** 49, 263-264, 1998.
- Brancalion AP, Oliveira RB, Sousa JP, Groppo M, Berretta AA, Barros ME, Boim MA, Bastos JK. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research** 40 475-481, 2012.
- Brown JP, Dietrich PS. Mutagenicity of plant flavonols in the salmonella/mammalian microsome test: Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. **Mutation Research** 66, 223-240, 1979.
- Cabrini DA, Campos MM, Tratsk KS, Merino VF, Silva Jr JA, Souza GEP, Avellar MC, Pesquero JB, Calixto JB. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B(1) receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. **British Journal of Pharmacology** 132, 567–577, 2001.
- Carvalho JCT. Fitoterápicos Anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: **Tecmed**, 480p, 2004.
- Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry** 55, 773-778, 2000.
- Cavalcanti BC, J.R.O.Ferreira, D.J.Moura, R.M.Rosa, G.V.Furtado, R.R.Burbano, E.R. Silveira e, M.A.S.Lima, C.A.G.Camara, J.Saffi, J.A.P.Henriques,c, V.S.N.Rao, L.V. Costa-Lotufo, Moraes MO, Pessoa C. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research** 701, 153–163, 2010.
- Cavalcanti BC, L.V. Costa-lotufo , M.O. Moraes, R.R. Burbano , E.R. Silveira , K.M.A. Cunha a, V.S.N. Rao,*, D.J. Moura , R.M. Rosa , J.A.P. Henriques , Pessoa C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. **Food and Chemical Toxicology** 44, 388–392, 2006.

- Chang SF, Yang LM, Hsu FL, Hsu JY, Liaw JH, Lin SJ. Transformation of steviol-16 α ,17-epoxide by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella bainieri*. **Journal of Natural Product** 69, 1450-1455, 2006.
- Chavan MJ, Kolhe DR, Wakte PS, Shinde DB. Analgesic and anti-inflammatory activity of kaur-16-en-19oic acid from *Annona reticulate* L. Bark. **Phytotherapy Research** 2011.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Wishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodget JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM. DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. **Cell** 108, 31-43, 2002.
- Collier HOJ, Dinnen JC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy** 32, 295-310, 1968.
- Costa FN. *Sparattosperma leucanthum*: Anatomia foliar e isolamento de flavonóides por cromatografia contracorrente. Dissertação. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2009.
- Croft KD, Ghisalberti EL, Jefferies PR, Knox JR, Mahoney TJ, Sheppard PN. Chemical and microbiological synthesis of intermediates in gibberellin biosynthesis. **Tetrahedron** 30, 3663-3667, 1974.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology** 104, 15-29, 1971.
- Diana G, Sagratella S. Different capability of N-Methyl-D-Aspartate antagonist to affect locomotor/exploratory activity of mice in computerized online open field test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 48, 291-295, 1994.
- Durham DG. Isolation by Ion-Exchange methods. In: ISOLATION Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural Products Isolation. 2a Edição. Totowa, New Jersey: **Humana Press Inc.**, 159-184, 2006.
- Eira MTS, Salomão AN, Cunha R, Mello CMC, Tanaka DM. 2º Congresso Nacional de Essências Nativas, Brasília, Brasil, 1992.

- Este JT, Gray AI, Waterman PG. Chemistry in the Annonaceae, XXIV. Kaurane and kaur-16-ene diterpenes from stem bark of *Annona reticulata*. **Journal of Natural Products** 50, 979-983, 1987.
- Fernandes RM, Pereira NA, Paulo LG. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia** 73, 53–56, 1992.
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions** 32, 283–288, 1991.
- Ferreira SH. A new method for measuring variation of rat paw volume. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 31, 648, 1979.
- FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nature Reviews Drugs Discovery** 2, 879-890, 2003.
- Flower RJ, Moncada S, Vane JR. Farmacoterapia Da Inflamação. In: Goodman LS, Gilmann AG. As bases farmacológicas da terapêutica. **Ed. Guanabara Koogan**, cap.29, 443-469, 1987.
- Fraga BM, Bressa C, González P, Guillermo R, Hernández MG, Suárez S. The microbiological transformation of 7 α -hydroxy-ent-kaur-16-ene derivatives by *Gibberlla fujikuroi*. **Phytochemistry** 68, 1557-1563, 2007.
- Fraga BM, González P, Guillermo R, Hanson JR, Hernández MG, Takahashi JA. The microbiological transformation of 16 β ,17-epoxykaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry** 37, 717-721, 1994.
- Fraga BM, Hernández MG, Artega JM, Suárez S. The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry** 63, 663-668, 2003.
- Garcia-González A, Morales-Hernández RC, Porta-Gándara MA, Rubio-Cerda E, Ochoa JL. Superoxid dismutase and naproxen in the very late phase of carragenin induced edema in rats. **Revista de Investigación Clínica** 52, 56 -160, 2000.
- Gardmark M, Höglund AU, Hammarlund-Udenaes M. Aspects on tail-flick, hot-plate and electoral stimulation tests for morphine antinociception. **Pharmacology & Toxicology** 83, 252-258. 1998.
- Gilroy DW, Lawrence T, Peretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drugs Discovery** 3, 401-16, 2004.

- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP, Narasu ML. Biotransformations using plant cells, organ cultures e enzymes systems: currents trends and future prospects. **Biotechnology Advances** 19, 175-199, 2001.
- Gobbo-Neto L, Santos MD, Albarella L, Zollo F, Pizza C, Lopes NP. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 36, 473-475, 2008.
- Gobbo-Neto L, Santos MD, Kanashiro A, Almeida MC, Lucisano-Valim YM, Lopes JL, Souza GE, Lopes NP. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Di- - glucosylflavones from (Asteraceae). **Planta Medica** 71, 3-6, 2005.
- Gomes MN, Rezende CM, Fontes FP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology** 109, 486–492, 2007.
- Hai-Feng Z, Guo-Qing H, Jing L, Hui R, Qi-He C, Qiang Z, Jin-Ling W, Hong-Bo Z. Production of gastrodim through biotransformation of p-2-hydroxybenzyl alcohol by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. **Enzyme and Microbial Technology** 43, 25-30, 2008.
- Hanson JR, Hawker J, White AF. Studies in terpenoid biosynthesis. Part IX. The Sequence of oxidation on ring B in kaurene-gibberellin biosynthesis. **Journal of Chemical Society, Perkin I**, 1892-1895, 1972.
- He Zhyong, Xia W, Liu Q, Chen J. Identification of a new phenolic compound from Chinese olive (*Canarium album* L) fruit. **European Food Research and Technology** 288, 339-343, 2009.
- Hegnauer R, Grayer-Barkmeijer RJ. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry** 34(1), 3-16, 1993.
- Holland HL, Weber HK. Enzymatic hydroxylation reactions. **Current Opinion in Biotechnology** 11, 547-553, 2000.
- Hou AJ, Peng LY, Liu YZ, Lin AW, Sun HD. Gallotannins and related polyphenols from *Pistacia weinmannifolia*. **Planta Medica** 66, 624-626, 2000.
- Hsu HFL, Yang LM, Chang SF, Wang LH, Hsu CY, Liu PC, Lin SJ. Biotransformation of gallic acid by *Beauveria sulfurescens* ATCC 7159. **Applied Microbial And Cell Physiology** 74, 659–666, 2007.

- Hueso-Falcón I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro-Luis JM, Ravelo AG, Estevez-Braun A, Heras B de las, Hortelano S. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** 46, 1291-1305, 2011.
- Hunnskaar S, Hole K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30, 103-114, 1987.
- Index Kewensis, suppl. XX; **Claredon Press: Oxford**, 1996.
- Ishimaru K, Nonaka G Nishioka I. Gallic acid esters of proto-quercitol, quinic acid and (-)-Shikimic acid from *Quercus Mongolia* and *Q. myrsin aefolia*. **Phytochemistry** 1501-1504, 1987.
- Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for highspeed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A** 1065, 145-168, 2005.
- Johnson RA, Herr ME, Murray HC, Chidester CG, Han F. Selective Oxygenation of Adamantanes and Other Substrates by *Beauveria sulfurescens*. **The Journal of Organic Chemistry** 57, 7209-7212, 1992.
- Judd SW, Campbell SC, Kellogg EA, Stevens PS. Plant Systematics, A Phylogenetic Approach, **Ed Sinauer, Sunderland**, 283, 1999.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature** 413, 203-210, 2001.
- Jungler H, Sorkin LS. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF- α . **Pain** 85, 145-151, 2000.
- Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, Cetrulo CL, Theoharides TC. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C θ phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology** 145, 934–944, 2005.
- Koster R, Anderson M, Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings** 18, 412-416, 1959.
- Kvirkvelia N, McMenamin M, Chaudhary K, Bartoli M, Madaio MP. Prostaglandin E2 promotes cellular recovery from established nephrotoxic serum nephritis in mice, pro-survival, and regenerative effects on glomerular cells. **Pathophysiology of Acute Kidney Injury** 304, 463–470, 2013.

- Lapa, A.J., Souccar, C., Lima-Landman, M.T.R., Castro, M.A.S., Lima, T.C.M. 2008. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **5ª. Ed – Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM**. 2002
- Leitão GG, El-Adji SS, Melo WAL, Leitão SG, Brown L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianenses* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Chromatography and Related Technologies** 28, 12-13, 2005.
- Lenardão EF, Freitag RA, Dabdoub MJ, Batista ACF, Silveira CC. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova** 26(1), 123-129, 2003.
- Leresche JE, Meyer HP. Chemocatalysis and biocatalysis (Biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research & Development** 10, 572 -580, 2006.
- Lim H, Jung HA, Choi JS, Kim YS, Kang SS, Kim HP. Anti-inflammatory Activity of the Constituents of the Roots of *Aralia continentalis*. **Archives of Pharmacal Research** 32, 1237-1243, 2009.
- Lima ML, Perazzo, FF, Carvalho JCT, Bastos JK. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 59, 1151–1158, 2007.
- Macías FA, Simonet AM, Galindo JCG, Catellano D. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry** 50, 35-46, 1999.
- Marston A, Hostettmann K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A** 1112, 181-194, 2006.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology** 57, 1-164, 1999.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Review** 43, 109–142, 1991.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65, 55–63, 1983.
- Munro JM. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. **European Heart Journal** 14, 72-7, 1993.

- Neto AG, Costa JLC, Belati CC, Vinholis AHC, Possebom LS, Da Silva Filho AA, Cunha WR, Carvalho JCT, Bastos JK, Silva MLA. Analgesic and anti-inflammatory activities of a crude root extract of *Pfaffia glomeata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology** 96, 87-91, 2005.
- Nishimura H, Nonaka GI, Nishika I. Seven quinic acid gallates from *Quercus stenophylla*. **Phytochemistry** 23, 2621-2623, 1984.
- Nugroho A, Choi J, Park J, Lee K, Cha B, Park H. Two new flavonols glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their in vitro free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. **Planta Medica** 75, 364-366, 2009.
- Ohsaki A, Yan LT, Ito S, Edatsugi H, Iwata D, Komoda Y, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 4, 2889, 1994.
- Ohtani K, Aikawa Y, Kasai R, Chou W-H, Yamasaki K, Tanaka O. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of *Rubus suavissimus*. **Phytochemistry** 31, 1553-1559, 1992
- Paiva LA, De Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research** 16, 737-739, 2002.
- Paiva LA, Gurgel, ET, De Sousa ER, Silveira RM, Silva FA, Santos VSN, Rao LAF. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 93, 51-56, 2004.
- Paiva LA, Rao VSN, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 62, 73-78, 1998.
- Paiva LAF, Gurgel LA, Silva RM, Tome AR, Gramosa NV, Silveira ER, Santos FA, Rao VSN. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular pharmacology** 39, 303-307, 2003.
- Park KA, Vasko MR. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **Trends Pharmacology Sciences** 26, 571-7, 2005.
- Parker WB, Nishizawa M, Fisher MH, Ye N, Lee KH, Cheng YC. Characterization of a novel inhibitor of human DNA polymerases: 3,4,5-tri-O-galloylquinic acid. **Biochemical Pharmacology** 38, 3759-3765, 1989.

- Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology** 31, 804–826, 2002.
- Patel RN. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chemistry Reviews** 252, 659–701, 2008.
- Pauli GF, Pro MS, Friesen JB. Countercurrent Separation of Natural Products (review). **Journal of Natural Products** 71, 1489–1508, 2008.
- Pio Corrêa M. Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol. 2. **Imprensa Nacional, Rio de Janeiro**, 1984.
- Pol O, Ferrer I, Puig MM. Diarrhea associated with intestinal inflammation increases the potency of μ and δ opioids on the inhibition of gastrointestinal transit in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 270, 386–391, 1994.
- Puri R, Wong TC, Puri RK. ^1H - and ^{13}C -Nmr Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum plananifolium*. **Journal of Natural Products** 57, 587–596, 1994.
- Qi-He C, Jing L, Hai-Feng Z, Guo-Qing H, Ming-Liang F. The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. **Enzyme and Microbial Technology** 45, 175–180, 2009.
- Rates SM. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39, 603–613, 2001.
- Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 35, 523 - 534, 2002.
- Richter H, Obermann H, Spiteller. Über einen neuen Kauran-18-säure-glucopyranosylester aus grünen Kaffeebohnen. **Chemische Bericht** 110, 1963–1970, 1977.
- Ronald MB, Christopher DH. Bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Archevie Pharmacology** 342, 235–242, 1990.
- Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice-effect of formalin concentration. **Pain** 42, 235–242, 1990.
- Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology** 331, 43–52, 1997.
- Sannomiya M, Montoro P, Piacente S, Pizza C, Brito AR, Vilegas W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of

- polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 19, 2244-2250, 2005.
- Santos DR, Calixto JB, Souza GEP. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine induced neutrophil migration in rats. **British Journal of Pharmacology** 139, 271–278, 2003.
- Schiepers OJG, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. **Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 29, 201-217, 2005.
- Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. **Vascular Pharmacology** 43, 19-29, 2005.
- Seeger C, Eberhart K, Sturm S, Strasser H, Stuppner H. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography, high yield strategy for structurally closely related analytes – destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case of study. **Journal of Chromatography A**. 1117, 67-73, 2006.
- Senedese JM, Alves JM, Lima IM, de Andrade EA, Furtado RA, Bastos JK, Tavares DC. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC Complementary and alternative medicine** 13, 2013.
- Siebeck M, Schorr M, Spannagl E, Lehner M, Fritz H, Cheronis JC, Whalley ET. B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. **Immunopharmacology** 40, 49-55, 1998.
- Silva EA, Takahashi JA, Oliveira AB. An interesting backbone rearrangement and novel derivatives from the biotransformation of trhachyloban-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Brazilian Chemical Society** 13, 101-105, 2002.
- Silverman RB. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions. **San Diego Academic Press** 717, 2000.
- Smith RV, Rosazza JP. Microbial models of mammalian metabolism, aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 161:551–558, 1974.
- Sousa JPB. *Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. Tese. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP**, Ribeirão Preto, 2011.

- Souza GHB, Da Silva Filho AA, Pereira AC, Royo VA, Silva MLA, Carvalho JCT, Bastos JK. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **Farmaco** 59, 55-61, 2004.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. **Nature** 387, 917-921, 1997.
- Stokbroeckx RA, Luyckx MG, Willems JJ, Bracke JO, Joossen R, Van Wauwe JP. Levocabastine (R 50547): the prototype of a chemical series of compounds with specific Hi-antihistaminic activity. **Drug Development Research** 8, 87-93, 1986.
- Swaving J, de Bont JAM. Microbial transformation of epoxides. **Enzyme and Microbial Technology** 22, 19-26, 1998.
- Sykes P. A guidebook to mechanism in organic chemistry. **Longman scientific and technical**. 2 ed, 215a, 190b, 1985.
- Van Wauwe JP, Goosens JG. Arabinogalactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1- antihistamines, 5-HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents Action** 28, 78–82, 1989.
- Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research** 44, 1–10, 1995.
- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **International Journal Tissue Reactions** 20, 3-15, 1998.
- Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGO, Angelo C. Pinto. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology** 112, 248–254, 2007.
- Veiga Junior. VF, Pinto AC. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova** 25, 273–286, 2002.
- Venisetty RK, Ciddi V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 4, 153–167, 2003.

- Vieira HS, Takahashi JA, Boaventura MAD. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 3704-3707, 2002.
- Wijeratne EMK, Bashyal BP, Liu MX, Rocha DD, Gunaherath GMKB, U'Ren JM, Gunatilaka MK, Arnold AE, Whitesell L, Gunatilaka AAL. Geopyxins A-E, ent-kaurane diterpenoids from endolichenic fungal strains geopyxis aff. majalis and geopyxis sp. az0066: structure-activity relationships of geopyxins and their analogues. **Journal of Natural Products** 75, 361-369, 2012.
- Williams TJ. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **British Medical Bulletin** 39, 239-242, 1983.
- Willianson EM, Okpako DT, Evans FJ. Selection, preparation and pharmanogical evaluation of plant material. Antiinflammatory and analgesic activity. **Pharmacological methods in phytoterapy research** 1, cap. 8, 131-154, New York, John Wiley & Sons, 1996.
- Winter CA, Risley A, Nuss GW. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 111, 544-547, 1962.
- Yang YL, Chang FR, Wu CC, Wang WY, Wu YC. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products** 65, 1462-1467, 2002.

Anexos

Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H do composto 1: quercetina-3- O - α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz

Figura 34 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz

Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 125 MHz

Figura 36 – Correlações de HMQC do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 37 – Correlações de HMBC do composto 1: quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em DMSO-*d*₆

Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H do composto 2: canferol-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz

Figura 39 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 2: canferol-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz

Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$; 125 MHz

Figura 41 – Correlações de HMQC do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em DMSO- d_6

Figura 42 – Correlações de HMQC do composto 2: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em $\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz

Figura 44 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em $\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz

Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em $\text{DMSO-}d_6$; 125 MHz

Figura 46 – Correlações de HMQC do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*₆

Figura 47 – Correlações de HMBC do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*₆

Figura 48 – Correlações de COSY do composto 3: ácido 4'-metóxi,4''-metóxi-4,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-d_6 ; 500 MHz

Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-d_6 ; 125 MHz

Figura 51 – Correlações de HMQC do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*₆

Figura 52 – Correlações de HMBC do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*₆

Figura 53 – Correlações de COSY do composto 4: ácido 4-(4''-metóxi-*O*-galoil)-3,5-di-*O*-galoilquínico em DMSO-*d*6

Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H do composto 5: ácido caurenóico em clorofórmio- d ; 500 MHz

Figura 55 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 5: ácido caurenóico em CDCl_3 ; 500 MHz

Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H do composto 6: caurenol em CDCl_3 ; 500 MHz

Figura 57 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 6: caurenol em CDCl_3 ; 500 MHz

Figura 58 – Espectro de RMN de ¹³C do composto 6: caurenol em CDCl₃; 125 MHz

Figura 59 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6: caurenol em CDCl_3 ; 125 MHz

Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H do composto 7: epoxido do ácido caurenico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 61 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 7: epoxido do ácido caurenico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8: metil $7\beta,17$ -diidrox-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d_5 ; 400 MHz

Figura 63 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 8: metil $7\beta,17$ -diidrox-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d_5 ; 400 MHz

Figura 64 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d-5; 100 MHz

Figura 65 - Correlações de HSQC do composto 8: metil $7\beta,17$ -diidrox-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d-5

Figura 66 - Correlações de HMBC do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d-5

Figura 67 - Ampliação das correlações de HMBC do composto 8: metil 7 β ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-oico em piridina d-5

Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H do composto 9: metil $7\alpha,17$ -diidrox- 16α -ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 69 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 9: metil 7 α ,17-diidroxi-16 α -ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9: metil $7\alpha,17$ -diidrox- 16α -*ent*-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 100 MHz

Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10: metil $7\beta,17$ -diidroxi- 16α -ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 72 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 10: metil $7\beta,17$ -diidrox- 16α -*ent*-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 73 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10: metil $7\beta,17$ -diidroxil- 16α -ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 100 MHz

Figura 74 – Correlações de HSQC do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -ent-cauran-19-oico em CDCl₃

Figura 75 – Correlações de HMBC do composto 10: metil $7\beta,17$ -diidroxí- 16α -ent-cauran-19-oico em CDCl_3

Figura 76 – Correlações de COSY do composto 10: metil 7 β ,17-diidroxi-16 α -ent-cauran-19-oico em CDCl₃

Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H do composto 11: metil $9\beta,16\alpha,17$ -triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 78 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl₃; 400 MHz

Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11: metil $9\beta,16\alpha,17$ -triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl_3 ; 100 MHz

Figura 80 – Correlações de HSQC do composto 11: metil 9 β ,16 α ,17-triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl₃

Figura 81 – Correlações de HMBC do composto 11: metil $9\beta,16\alpha,17$ -triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl_3

Figura 82 – Ampliação das correlações de HMBC do composto 11: metil $9\beta,16\alpha,17$ -triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl_3

Figura 83 – Correlações de COSY do composto 11: metil $9\beta,16\alpha,17$ -triidroxi-ent-cauran-19-oico em CDCl_3

Figura 84 - Espectro de RMN de ^1H do composto 12: metil $16\alpha,17$ -diidrox-*ent*-cauran-19-óico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 85 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 12: metil 16 α ,17-diidrox*ent*-cauran-19-óico em CDCl_3 ; 400 MHz

Figura 86 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em CDCl_3 ; 100 MHz

Figura 87 – Correlações de HSQC do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em CDCl₃

Figura 88 – Correlações de HMBC do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em CDCl_3

Figura 89 – Ampliação das correlações de HMBC do composto 12: metil 16 α ,17-diidrox-*ent*-cauran-19-óico em CDCl₃

Figura 90 – Correlações de COSY do composto 12: metil 16 α ,17-diidroxi-*ent*-cauran-19-óico em CDCl₃

Figura 91 – Correlações de COSY do composto 12: metil 16 α ,17-diidrox-*ent*-cauran-19-óico em CDCl₃