



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA MATEMÁTICA E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação Química e Farmacológica do óleo das
sementes de *Carpotroche brasiliensis* e sua
aplicação na busca de compostos bioativos**

NOME: Adriana Sousa de Oliveira

ORIENTADOR: Prof. Angelo da Cunha Pinto

CO-ORIENTADOR: Profa. Claudia Morais de Rezende

Rio de Janeiro

Abril de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANA SOUSA DE OLIVEIRA

Avaliação Química e Farmacológica do óleo das sementes de *Carpotroche brasiliensis* e sua aplicação na busca de compostos bioativos

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, como requisito visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências junto ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro

Abril de 2006

Avaliação Química e Farmacológica do óleo das
sementes de *Carpotroche brasiliensis* e sua
aplicação na busca de compostos bioativos

ADRIANA SOUSA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DE GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS, REALIZADA SOB ORIENTAÇÃO DO
PROF. DR. ANGELO DA CUNHA PINTO E CO-ORIENTAÇÃO DA PROF.^A.
DR.^A CLAUDIA MORAES DE REZENDE

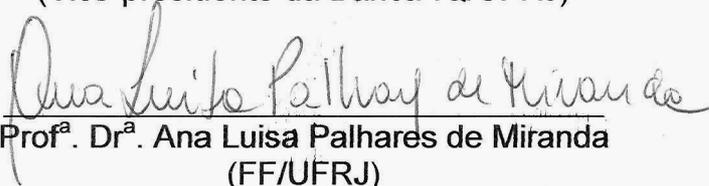
APROVADA EM 28 DE ABRIL DE 2006 POR:



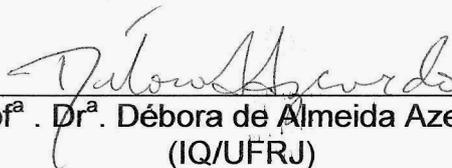
Prof. Dr. Angelo da Cunha Pinto
(Presidente da Banca-IQ/UFRJ)



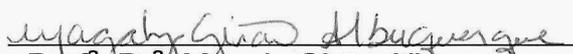
Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Moraes de Rezende
(Vice-presidente da Banca-IQ/UFRJ)



Prof.^a. Dr.^a. Ana Luisa Palhares de Miranda
(FF/UFRJ)



Prof.^a. Dr.^a. Débora de Almeida Azevedo
(IQ/UFRJ)



Prof.^a. Dr.^a. Magaly Girão Albuquerque
(IQ/UFRJ)

Prof.^a. Dr. Carlos Roland Kaiser
(IQ/UFRJ)
(Suplente)

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Adriana Sousa

Avaliação Química e Farmacológica do óleo das sementes de *Carpotroche brasiliensis* e sua aplicação na busca de compostos bioativos

Rio de Janeiro, UFRJ, IQ, 2006.

xxiii, 141 p.

Tese: Mestre em Ciências (Química Orgânica)

1. Flacourtiaceae 2. *Carpotroche brasiliensis* 3. Óleo de chaulmugra
4. Ácidos ciclopentênicos 5. Atividade antiinflamatória 6. Atividade antinociceptiva 7. Produtos de oxidação

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Agradecimentos

Ao Prof. Ângelo da Cunha Pinto, pela orientação, apoio e amizade. Pela lição de vida demonstrada a todos nós que passamos pelo laboratório 621.

A Prof^a. Claudia Moraes, pela orientação, apoio, amizade, paciência, empolgação e ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, paciência e apoio em todas as etapas da minha vida.

A Prof^a. Ana Luisa Palhares de Miranda, pela colaboração valiosa nos experimentos desta tese.

Ao Prof. Dr. Gerson Ferreira Pinto pelos frutos de *C. brasiliensis*.

A amiga Josélia pelo apoio em todas as horas e auxílio nas análises e execução do trabalho de farmacologia, pela orientação e paciência. Com certeza, esse trabalho não teria sido realizado sem seu apoio.

Aos amigos Marilza, Andréa, Anderson Canuto e Anderson Rouge pela ajuda e conselhos valiosos.

Aos amigos do laboratório 621, Michelle Jackeline, Lílian, Flávio, Núbia, André Zveiter, Rita Saraiva, Marluce, Bárbara, Celsão, Jenilce, Alexandre, Carol, Patrícia, Sandra, Sílvia, Priscila, Rose, Júnior pelas “conversas científicas”. Obrigado por tornarem o laboratório uma grande família.

Aos amigos da Analytical Solutions, Daniel, Mauro, José André, Guilherme Azevedo, Ana Lúcia, Priscila, Hugo, Flavia, Simone, Victor, Alexandre, Leandro, Josias, Edson, Bárbara, pela colaboração, compreensão e amizade.

A CAPES pela concessão da bolsa no primeiro ano do mestrado.

E a todos que, direta ou indiretamente, participaram na realização desta pesquisa.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	viii
Glossário	x
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Esquemas.....	xv
Índice de Tabelas	xvi
Índice de Anexos.....	xviii
Resumo	xx
Abstract	xxii
1. Introdução	1
1.1. A família Flacourtiaceae	16
1.1.1. Biossíntese dos ácidos ciclopentênicos.....	19
1.2. Histórico do Óleo de Chaulmugra.....	22
1.2.1. A espécie <i>Carpotroche brasiliensis</i> Endl.....	24
1.2.2. Histórico do óleo de <i>Carpotroche brasiliensis</i> (Flacourtiaceae)	26
1.2.3. Síntese de ácidos ciclopentênicos	29
1.2.4. Propriedades Farmacológicas e Terapêuticas do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	30
1.3. Ácidos graxos ciclopentênicos e prostaglandinas.....	32

2. Objetivos	38
3. Parte Experimental	39
3.1. Materiais e Métodos	39
3.1.1. Equipamentos utilizados:	39
3.1.2. Métodos Espectroscópicos	39
3.1.3. Métodos Cromatográficos	40
3.1.4. Solventes e Reagentes.....	41
3.2. Trabalho fitoquímico realizado com as sementes do fruto de Carpotroche brasiliensis (Endl.).....	43
3.2.1. Coleta do Material Botânico.....	43
3.2.2. Extração dos ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i>	43
3.2.3. Caracterização da mistura de ácidos graxos e dos ésteres metílicos por espectrometria de infravermelho, ressonância magnética de ^1H e ^{13}C e de massas	45
3.3. Determinação da posição da ligação dupla do ácido górrico por espectrometria de massas através de adutos de dissulfeto de dimetila	45
3.4. Quantificação dos ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i> por Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)	46
3.4.1. Derivatização das amostras com Diazometano em éter etílico.....	47
3.4.2. Preparo das soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração	47
3.4.3. Linearidade do sistema analítico.....	48
3.4.4. Preparo das amostras de ésteres metílicos de <i>C. brasiliensis</i> ...	49
3.4.5. Estudo da estabilidade química dos ácidos ciclopentênicos em extratos frescos e envelhecidos das misturas de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i>	49

3.5. Construção de uma coleção (biblioteca) de moléculas a partir da mistura de ácidos graxos extraídos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	50
3.5.1. Epoxidação dos ésteres metílicos derivados da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i>	50
3.5.1.1. Esterificação dos ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i>	51
3.5.1.2. Epoxidação da mistura de ésteres metílicos:.....	51
3.5.2. Obtenção de álcoois a partir da fração ácida do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	52
3.5.2.1. Preparo da solução de diborana 1,0 M (BH ₃ em THF).....	52
3.5.2.2. Secagem do Tetraidrofurano (THF).....	53
3.5.2.3. Obtenção da mistura de álcoois a partir da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i>	53
3.6. Atividade farmacológica da mistura de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i>	55
3.6.1. Atividade antiinflamatória.....	55
3.6.1.1. Atividade antiinflamatória da mistura de ácidos graxos da semente dos frutos de <i>C. brasiliensis</i> através do teste do edema de pata de rato induzido por carragenina.....	55
3.6.1.2. Atividade Antiinflamatória dos derivados oxidados da mistura de ácidos graxos do óleo de <i>C. brasiliensis</i>	57
3.6.2. Atividade analgésica.....	58
3.6.2.1. Contorção abdominal induzida por ácido acético.....	58
3.6.2.2. Teste da placa quente (“hot- plate”).....	59
3.6.2.3. Teste da Formalina.....	62
3.6.3. Teste de Coordenação Motora.....	63
3.6.4. Teste de toxicidade.....	64
4. Resultados e discussão.....	65
4.1. Identificação dos constituintes presentes na mistura de ácidos graxos da semente do óleo de <i>C. brasiliensis</i>	65

4.1.1. Caracterização dos constituintes da mistura de ácidos graxos por espectrometria de infravermelho e ressonância magnética de ^1H e ^{13}C	65
4.1.2. Caracterização dos constituintes presentes na mistura de ésteres metílicos derivados da fração ácida por espectrometria de IV , RMN ^1H e RMN ^{13}C	67
4.1.3. Identificação dos constituintes da mistura de ésteres metílicos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> por CGAR-EM.....	69
4.1.4. Determinação da posição da ligação dupla do gorlato de metila por espectrometria de massas através de adutos de dissulfeto de dimetila.....	75
4.2. Quantificação da fração ácida:	78
4.2.1. Quantificação da mistura de ácidos graxos do óleo de <i>C. brasiliensis</i> por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.....	78
4.2.2. Comparação da composição química da mistura de ácidos graxos do óleo de <i>C. brasiliensis</i> com frações envelhecidas do mesmo óleo	84
4.3. Coleção de moléculas oxidadas a partir da mistura de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i>	91
4.3.1. Caracterização da biblioteca de epóxidos.....	92
4.3.2. Caracterização da biblioteca de álcoois.....	95
4.4. INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO ÁCIDA DE <i>C. brasiliensis</i>	100
4.4.1. Atividade Antiinflamatória.....	100
4.4.1.1. Avaliação da atividade antiinflamatória da mistura de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i> através do teste do edema de pata de rato induzido por carragenina	100
4.4.1.2. Atividade antiinflamatória dos produtos de oxidação da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i>	102
4.4.2. Atividade Analgésica.....	103

4.4.2.1. Teste da contorção abdominal induzida por ácido acético	103
4.4.2.2. Teste da placa quente (“hot plate”)	104
4.4.2.3. Teste da Formalina	105
4.4.3. Coordenação motora (“rota-rod”)	106
4.4.4. Teste de Toxicidade.....	107
5. Conclusões.....	109
6. Perspectivas e objetivos futuros.....	110
7. Anexos	111
8. Referências Bibliográficas	129

Lista de Abreviaturas

AINEs- Agentes antiinflamatórios não esteroidais

A_{pi}- Área do padrão interno

A_a –Área do composto alvo

CCF - Cromatografia em camada fina

CG -Cromatografia gasosa

CGAR - Cromatografia gasosa de alta resolução

CG-EM -Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

COX- Ciclooxigenase

COX-1- Ciclooxigenase-1 (isoforma da ciclooxigenase).

COX-2- Ciclooxigenase-2 (isoforma da ciclooxigenase).

C_{pi}- Concentração do padrão interno

C_a – Concentração do composto alvo

CV - Coeficiente de variação

δ - Deslocamento químico

DIC -Detector de ionização de chama

EM - Espectrometria de massas

Fr – Fator de Resposta

IV - Infravermelho

m/z - razão massa/carga

PG- Prostaglandinas

PGD - Prostaglandinas do tipo D

PGE – Prostaglandinas do tipo E

PGF - Prostaglandinas do tipo F

PGI - Prostaglandinas do tipo I

RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono

TNFα- Fator de necrose tumoral

t_r - Tempo de retenção

TXA-Tromboxano

λ- Comprimento de onda

µg-Microgramas

v/v -Relação volume por volume

p/v -Relação peso por volume

Glossário

AINEs (Agentes antiinflamatórios não esteroidais)- A maioria dos AINEs são ácidos orgânicos e possuem três ações principais: ação antiinflamatória, efeito analgésico e antipirético.

Carragenina - mistura de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas (Rhodophyceae), capaz de estimular desenvolvimento de processo inflamatório.

Fitofármaco- substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal.

Fitoterápico- medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado.

Hiperalgisia- maior intensidade da dor associada a um estímulo nocivo leve.

“libraries”- coleções com grande número de compostos estruturalmente relacionados geradas pela introdução de reagentes com diferentes grupos substituintes.

Nociceção – dor, estímulo nocivo que dá origem a uma sensação intensa e desagradável.

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química da morfina, codeína, papaverina, efedrina e hiosciamina	2
Figura 2: Estrutura química do ácido acetilsalicílico, barbital, fenobarbital, epinefrina, procaína, prontosil, sulfanilida, difenildramina, clorpromazina, imipramina, indometacina, cloranfenicol	4
Figura 3: Estrutura química da kramerixina	7
Figura 4: Biblioteca de compostos análogos da kramerixina.....	8
Figura 5: Estrutura química do balanolol	8
Figura 6: Biblioteca de compostos análogos do balanolol.....	9
Figura 7: Estrutura química da indolactama V.....	9
Figura 8: Biblioteca de compostos análogos da indolactama V	9
Figura 9: Coleção combinatória de cumarinas	10
Figura 10: Estrutura química da epotilona A	10
Figura 11: Biblioteca de compostos análogos da epotilona A	11
Figura 12: Estruturas químicas das sarcodictinas A e B	11
Figura 13: Coleção combinatória de compostos análogos das sarcodictinas	11
Figura 14: Síntese do taxol a partir da acetilbacatina III.....	12
Figura 15: Coleção combinatória de compostos análogos do taxol	13

Figura 16: Estruturas químicas dos alcalóides indólicos ioimbina e rauvolscina e dos seus compostos análogos	14
Figura 17: Síntese de análogos de 11-desoxi-PGE a partir do ácido hidnocárpico.....	15
Figura 18: Síntese de derivados de prostaglandina E ₂	15
Figura 19: Estrutura química dos ácidos ciclopentênicos.....	19
Figura 20: Estrutura química dos glicosídeos cianogênicos	22
Figura 21: (a) Espécie <i>Carpotroche brasiliensis</i> (b) Sementes e frutos da espécie <i>Carpotroche brasiliensis</i>	25
Figura 22: Estrutura química dos produtos de oxidação descritos nos trabalhos de Paget e Barrowcliff.....	29
Figura 23: Produtos à base do óleo de chaulmugra comercializados no tratamento da lepra (fonte: ARAÚJO,2005)	31
Figura 24: Biossíntese das prostaglandinas.....	34
Figura 25: Estrutura do elaidato de metila.....	42
Figura 26: Reação de obtenção dos derivados metiltiolados a partir da mistura de ácidos graxos do óleo da semente do fruto de <i>C. brasiliensis</i>	46
Figura 27: Epoxidação da mistura de ésteres metílicos ciclopentênicos derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	51
Figura 28: Hidroboração da mistura de ácidos ciclopentênicos de <i>C. brasiliensis</i>	53

Figura 29: Imagem do edema de pata de rato	56
Figura 30: Procedimento do teste de inflamação induzida por carragenina.....	57
Figura 31: Procedimento do teste da contorção abdominal induzida por ácido acético	59
Figura 32: Teste da placa quente (“hot plate”)	60
Figura 33: Procedimento do teste de “hot-plate”	61
Figura 34: Procedimento do teste da formalina.....	62
Figura 35: Equipamento utilizado no teste de “rota-rod”	64
Figura 36: Estrutura química dos ácidos ciclopentênicos presentes no óleo das sementes de <i>C. brasiliensis</i>	66
Figura 37: Cromatograma de íons totais da mistura de ésteres metílicos da fração ácida do óleo das sementes de <i>C. brasiliensis</i> obtida pela esterificação com solução de diazometano (método CB-02 descrito no item 3.1.3) (b)(c) ampliação do cromatograma (a).....	71
Figura 38: Proposta das principais fragmentações dos ésteres ciclopentênicos.....	73
Figura 39: Fragmentação para formação do íon m/z 80 dos compostos presentes na mistura de ácidos graxos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	74
Figura 40: Perfil da fragmentação dos derivados metiltiolados da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	77
Figura 41: Curva de calibração do elaidato de metila por padronização interna em CGAR	81

Figura 42: Cromatograma do ponto de 50 µg/mL utilizado na construção da curva analítica. (t_r 8,78 min – miristato de metila; t_r 10,46min – heptadecanoato de metila e t_r 10,86 min – elaidato de metila)	81
Figura 43: Cromatograma da mistura de ácidos graxos ciclopentênicos de <i>C. brasiliensis</i>	83
Figura 44: Cromatograma da amostra 05 contendo os produtos de degradação da mistura de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i> (método CB-03, descrito no item 3.1.3).....	87
Figura 45: Cromatograma da amostra 06 contendo os produtos de degradação da mistura de ácidos graxos de <i>C. brasiliensis</i> (método CB-03, descrito no item 3.1.3).....	87
Figura 46: Fragmentação para formação dos íons m/z 96 e 109.....	90
Figura 47: Cromatograma da mistura de epóxidos derivados dos ésteres metílicos da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i> (método CB-03, descrito no item 3.1.3).....	93
Figura 48: Esquema de fragmentação da mistura dos epóxidos.....	94
Figura 49: Cromatograma da mistura de álcoois derivados dos ésteres metílicos da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i> (método CB-03, descrito no item 3.1.3)	96
Figura 50: Esquema de fragmentação dos produtos de hidroboração	98
Figura 51: Efeito da fração ácida do óleo das sementes de <i>C. brasiliensis</i> administrada oralmente no teste do edema de pata de rato induzido por carragnina	101
Figura 52: Efeito da fração ácida do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> administrada oralmente no teste da formalina.....	105

Índice de Esquemas

Esquema 1: Biossíntese dos ácidos ciclopentênicos	20
Esquema 2: Extração da fração ácida de <i>C. brasiliensis</i>	44
Esquema 3: Esquema geral do mecanismo de hidroboração	98

Índice de Tabelas

Tabela 1. O gênero e as tribos (sub-famílias) da Família Flacourtiaceae, de acordo com a classificação de Hutchinson	17
Tabela 2 : O gênero, as sub-famílias e as tribos da família Flacourtiaceae de acordo com Gilg	17
Tabela 3: Composição química dos ácidos ciclopentênicos de algumas espécies da família Flacourtiaceae (ABDEL-MOETY, 1981).	28
Tabela 4: RMN ^1H (300 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 da mistura de ácidos graxos ciclopentênicos presente no óleo das sementes de <i>C. brasiliensis</i>	66
Tabela 5: RMN ^1H (300 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 da mistura de ésteres metílicos.	67
Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da mistura de ésteres metílicos dos ácidos ciclopentênicos de <i>Hydnocarpus sp.</i> (Flacourtiaceae) (BLAISE et al, 1997).....	68
Tabela 7: Lista de compostos identificados por CG-EM na fração ácida do óleo das sementes de <i>C. brasiliensis</i> após derivatização com solução de diazometano	72
Tabela 8: Lista dos compostos metiltiolados derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> após derivatização com solução de diazometano.....	76
Tabela 9: Dados da curva analítica do padrão de elaidato de metila	80
Tabela 10: Concentração dos constituintes majoritários presentes nas amostras 1, 2 e 3 contendo a mistura de ésteres metílicos derivados da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de	

C. brasiliensis nas concentrações 300, 350 e 400 µg/mL,
respectivamente.....82

Tabela 11: Comparação da composição de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura ácidos graxos do óleo das sementes dos frutos de *C. brasiliensis* coletados em outubro de 2001 e agosto de 2005 com amostras envelhecidas da mistura de ácidos graxos (de frutos coletados em 2001).....85

Tabela 12: Principais compostos oriundos da degradação da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*.....88

Tabela 13: Produtos da reação de epoxidação da mistura de ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*.....94

Tabela 14: Produtos da reação de Hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*.....97

Tabela 15: Efeito dos produtos de oxidação derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* no teste do edema de pata de rato induzido por carragenina102

Tabela 16: Efeito da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis* e da indometacina na contorção abdominal induzida por ácido acético103

Índice de Anexos

Espectro de IV (filme em KBr) da Mistura de Ácidos Graxos do óleo da semente do fruto de <i>C. brasiliensis</i>	112
Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da Mistura de Ácidos Graxos do óleo da semente do fruto de <i>C. brasiliensis</i>	113
Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) da Mistura de Ácidos Graxos do óleo da semente do fruto de <i>C. brasiliensis</i>	114
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano.....	115
Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano.....	116
Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano.....	117
Espectro de massas do éster metílico do ácido chaulmúgrico.....	118
Espectro de massas do éster metílico do ácido górrico.....	118
Espectro de massas do éster metílico do ácido hidnocárpico.....	118
Espectro de massas do derivado metiltiolado do gorlato de metila.....	119
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo	

da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano (amostra 6)	120
Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano (amostra 6)	121
Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> com solução de diazometano (amostra 6)	122
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	123
Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da Mistura de epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	124
Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) da Mistura de Epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	125
Espectro de IV da Mistura de Álcoois obtida a partir da hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> ...	126
Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da Mistura de álcoois obtida a partir da hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i>	127
Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) da mistura de álcoois obtida a partir da hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de <i>C. brasiliensis</i> (DEPT)	128

Resumo

Neste trabalho avaliou-se a composição química e a atividade antiinflamatória e analgésica da fração ácida obtida do óleo das sementes de *Carpotroche brasiliensis*, árvore brasileira de médio porte da família Flacourtiaceae, conhecida popularmente como sapucainha. Até a década de 40, este óleo foi o único remédio conhecido com ação terapêutica no tratamento da hanseníase. A fração ácida do óleo apresentou majoritariamente ácidos ciclopentênicos em sua composição química: 50,8% do ácido hidnocárpico, 17,8% do ácido górrico e 19,1% do ácido chaulmúgrico. Foi também avaliada a estabilidade química destes compostos durante o período de três anos. Neste período, as transformações químicas ocorridas nesta mistura foram acompanhadas pelas técnicas de espectrometria de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Embora este óleo possua compostos com estruturas químicas semelhantes às prostaglandinas e tenha sido bastante utilizado no tratamento da hanseníase, uma doença caracterizada por estados reacionais inflamatórios, as suas atividades antiinflamatória e analgésica nunca foram bem estudadas.

A mistura de ácidos do óleo de *C. brasiliensis*, administrada nas doses de 10, 50, 100, 200 e 500 mg/kg, apresentou uma atividade antiinflamatória dose-dependente no edema de pata de rato induzido por carragenina, inibindo o edema de 30% (doses de 50 e 100 mg/kg) a 40% (doses de 200 e 500 mg/kg).

A fração ácida, administrada oralmente na dose de 200mg/kg, inibiu cerca de 57% a contorção induzida por ácido acético e de 55% a dor na segunda fase do teste da formalina, apresentando uma significativa atividade antinociceptiva.

Nenhum efeito foi observado nos testes da placa quente (100mg/kg) e do "rota-rod" (200mg/kg). Portanto, a fração ácida do óleo da semente possui um efeito antinociceptivo periférico e não central, uma vez que nenhuma reposta significativa foi observada nestes testes.

Na tentativa de estudar o efeito das modificações estruturais na atividade biológica destes ácidos graxos, foram preparadas coleções de moléculas a partir das reações de oxidação da mistura de ácidos. Estas coleções, quando

administradas na dose de 200 mg/kg no teste do edema de pata de rato, apresentaram uma inibição menor que o material de partida. A mistura de epóxidos apresentou 17% de inibição e os produtos da reação de hidroboração apresentaram 13%. Portanto, os ácidos ciclopentênicos se apresentaram como agentes antiinflamatórios mais eficazes que os seus derivados oxidados.

Abstract

The chemical composition, anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seed oil of *Carpotroche brasiliensis*, a medium-sized Brazilian tree of the Flacourtiaceae family popularly known as sapucainha, was evaluated. Until the 1940s, this oil was the only acknowledged remedy for the treatment of leprosy. The acid fraction of *C. brasiliensis* oil contains cyclopentenyl, and the fatty acids hidnocarpic (50.8%), gorlic (19.1%) and chaulmoogric (19.1%) as major constituents.

The compound's chemical stability was investigated for three years. During this period, the chemical modifications were followed by mass spectrometry, infrared and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance.

Although the cyclopentenyl fatty acid from *C. brasiliensis* oil has a prostaglandin-like chemical structure and the oil has been used in the treatment of leprosy, a disease which elicits inflammatory responses, the anti-inflammatory and analgesic activities of the oil have never been investigated.

The mixture of acids from *C. brasiliensis* seeds administered orally at doses of 10, 50, 100, 200 and 500 mg/kg, showed dose-dependent anti-inflammatory activity in carrageena-induced rat paw edema, inhibiting the edema by 30% (doses of 50 and 100 mg/kg) and up to 40% (doses of 200 and 500 mg/kg).

This mixture of acids administered orally at a dose of 200mg/kg inhibited the acetic acid-induced constrictions by 57% and the second phase of formalin-induced pain by 55%, showing significant antinociceptive activity.

No effects were observed in the hot-plate (100mg/kg) and rota-rod (200mg/kg) tests. Therefore, the mixture of acids from *C. brasiliensis* seeds demonstrates having peripheral antinociceptive effects and not central effects, because no significant response was observed in these tests.

In order to study the structural modifications in the biological activity of these fatty acids, molecular collections were synthesized from the mixture of fatty acids by oxidative reactions. When these collections were administered at doses of 200 mg/kg in carrageena-induced rat paw edema, low inhibition was seen. The mixture of epoxides and hydroboration products showed 17% and

13% of inhibition, respectively. Therefore, cyclopentenyl fatty acids were more effective anti-inflammatory agents than oxidative derivatives.

1. Introdução

Do ponto de vista histórico, a química medicinal tem desempenhado um papel importante no processo de desenvolvimento de fármacos (DIAS e CORRÊA, 2001). Segundo Yunes, a história do desenvolvimento dos fármacos pode ser definida em três períodos ou tendências (YUNES e CALIXTO, 2001). O primeiro período, que vai de 1800 até o ano de 1900, apresenta a fitoquímica de plantas medicinais integrada à química medicinal e à medicina na procura de princípios ativos usando plantas consagradas pela medicina popular. Nesta época, os químicos que estudavam as plantas medicinais, cujos recursos experimentais eram extremamente limitados, se dedicaram especialmente a isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas, muito bem conhecidas e experimentadas pelo uso popular e incorporadas às farmacopéias da época. Desta forma, muitos fitofármacos (definidos como compostos puros extraídos de plantas) foram obtidos, e muitos são ainda usados amplamente na terapêutica atual. Apenas para citar alguns exemplos, podemos mencionar a morfina **(1)**, isolada em 1804 por Séquin (WALKER, 2002) da papoula (*Papaver somniferum*), planta usada para acalmar a dor visceral. Posteriormente da mesma planta, foram isoladas a codeína **(2)** em 1832 por Robiquet, e a papaverina **(3)**, em 1848, por Merck. De *Ephedra sinica* foi isolada a efedrina **(4)** por Nagai, em 1887, que ainda é usada clinicamente como um potente broncodilatador. Deve ser citado também o alcalóide hiosciamina **(5)**, principal constituinte ativo da *Atropa belladonna*, usado como sedativo (YUNES e CALIXTO, 2001).

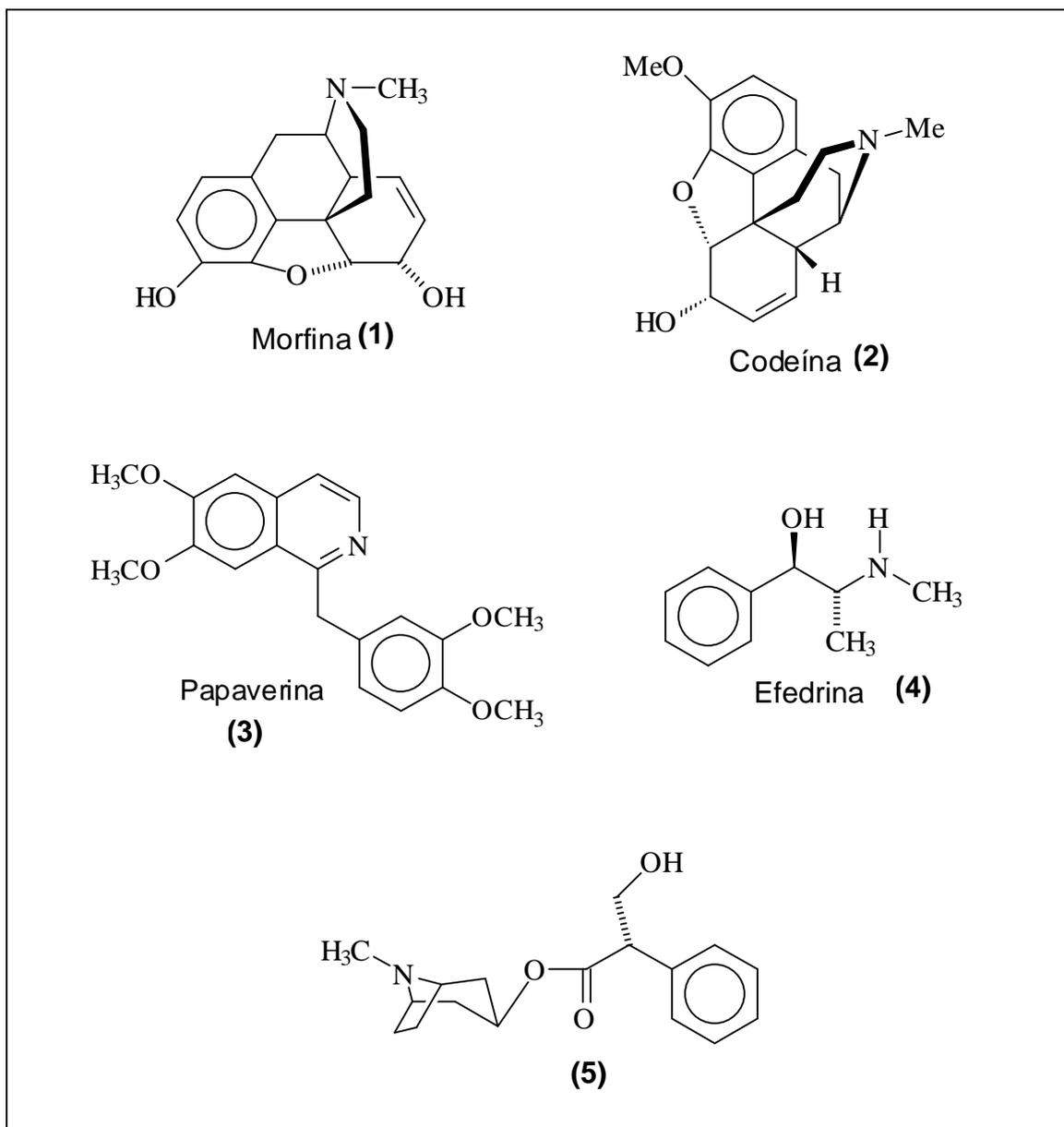


Figura 1: Estrutura química da morfina, codeína, papaverina, efedrina e hiosciamina

O segundo período (1901 a 1970/80) se destaca pelo surgimento de fármacos sintéticos, moléculas puras, com efeitos definidos. O ácido acetil salicílico **(6)** foi o primeiro fármaco sintético, oriundo da otimização de um produto natural, a salicina. Alguns anos após a descoberta deste ácido, apareceram novos fármacos de origem sintética para o tratamento de diferentes patologias. São indicados a seguir: o barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico) **(7)** foi introduzido na terapêutica em 1903 como agente hipnótico, embora tivesse sido sintetizado em 1882; a epinefrina (adrenalina)

(8), um broncodilatador e descongestionante nasal, foi sintetizada em 1904. Entre os anos 1904 e 1905 foram sintetizadas a amilocaína e a procaína **(9)** usando como modelo a cocaína. Em 1912, o fenobarbital (ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico) **(10)** foi reconhecido como um importante agente anticonvulsivante. Em 1932, observou-se que o prontossil **(11)** atuava como poderoso bactericida e posteriormente, em 1935, demonstrou-se que este composto se transformava no composto sulfanilida **(12)**, que era a verdadeira substância ativa. Esta descoberta originou a era das “sulfas”, cujos compostos foram de extrema importância durante a Segunda Guerra Mundial até a descoberta dos antibióticos. Após a guerra, vários fármacos de origem sintética foram desenvolvidos (MONTANARI e BOLZANI, 2001), e muitos deles se tornaram importantes para a humanidade, como os anti-histamínicos, antergan (1942) e difenilidramina (1946) **(13)**, o antipsicótico clorpromazina (1950) **(14)**, os antidepressivos iproniacida (1951) e imipramina (1957) **(15)**, o antiinflamatório indometacina **(16)**, entre outros. Como produtos naturais de importância terapêutica aparecem os antibióticos produzidos por fungos como a penicilina (1939), o cloranfenicol (1947) **(17)**, entre outros (YUNES e CALIXTO, 2001).

Após a fase na qual os protótipos obtidos a partir de produtos naturais desempenharam um papel relevante, parece ter ocorrido um período de abandono destas linhas de pesquisa, principalmente a partir dos anos 60 (SIMÕES et al, 2001). Os investimentos por parte da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa foram reduzidos com a percepção de desvantagens como o lento desenvolvimento e o alto custo para a produção de um fármaco. Estas desvantagens estão associadas às inúmeras etapas envolvidas neste processo de produção, tais como, a escolha de um alvo molecular, seguida pela validação deste alvo e do ensaio bioquímico/farmacológico, a identificação de um composto protótipo, modificação/ otimização deste composto protótipo até a aprovação dos testes clínicos em humanos. O tempo total envolvido em todo esse processo pode chegar a cerca de 15 anos, sendo que aproximadamente um terço deste tempo corresponde à identificação e otimização do composto protótipo (DIAS e CORRÊA, 2001).

O terceiro período, que se inicia entre as décadas de 70 e 80, se destaca por um processo de mudanças muito importantes. A partir dos anos 80, muitas das desvantagens anteriormente apontadas para a busca de novos fármacos são ultrapassadas através de avanços técnicos significativos tanto no desenvolvimento de técnicas de isolamento e elucidação estrutural (SIMÕES et al, 2001) como nos métodos de teste (*screening*) de um grande número de moléculas em relação às propriedades desejadas. Os grupos envolvidos com estas pesquisas, principalmente as grandes indústrias farmacêuticas, vêm atuando sistematicamente para diminuir o tempo envolvido, promovendo profundas transformações no processo de desenvolvimento e otimização da substância candidata à fármaco (DIAS e CORRÊA, 2001). Entre estas transformações, pode-se indicar o avanço da biologia molecular e das correspondentes técnicas genéticas que possibilitaram identificar e preparar diversas proteínas (enzimas, receptores, canais iônicos) que estão diretamente associados com os processos patológicos e, por isto, são alvos moleculares importantes à pesquisa de fármacos. Paralelamente, o desenvolvimento de dispositivos para a realização de ensaios biológicos automatizados (do inglês, *High Throughput Screening*, HTS) possibilitaram a avaliação de uma grande quantidade de substâncias frente a estes novos alvos moleculares (DIAS e CORRÊA, 2001; ESPINOLA, 2004; YUNES e CALIXTO, 2001).

A química orgânica sintética, através da preparação conjunta (na forma de misturas) ou paralela (na forma de substâncias puras) de coleções com grande número de compostos estruturalmente relacionados, permite sintetizar milhares de compostos em curto espaço de tempo (DIAS e CORRÊA, 2001). A diversidade estrutural dessas coleções é gerada pela introdução de blocos de construção (*building blocks*) com diferentes grupos substituintes, combinados pelas maneiras mais diversas possíveis (ESTRADA et al, 2005). Essa mudança promoveu uma grande transformação em relação aos métodos até então utilizados no planejamento de fármacos, dando origem à química combinatória.

A química combinatória é uma tecnologia composta por uma série de técnicas idealizadas para a criação de enormes populações (coleções) de moléculas – ou bibliotecas cujos componentes podem ser avaliados com relação às propriedades de interesse (ESTRADA et al, 2005). Os dados obtidos passam a constituir grandes coleções de compostos (*compound libraries*) que contêm informações sobre a natureza química e biológica de seus integrantes. A produção destas bibliotecas aumenta a probabilidade de se encontrar novos compostos de valor terapêutico e comercial de forma mais rápida.

Os primeiros trabalhos com esta abordagem foram relatados há mais de 15 anos, utilizando processos aplicados na indústria farmacêutica (ESTRADA et al, 2005). Entretanto, foi a partir de 1992 que a química combinatória apresentou um crescimento vertiginoso, com a preparação de uma coleção combinatória de benzodiazepinas por Ellmann e colaboradores, que consistiu na primeira coleção combinatória de moléculas orgânicas pequenas (BUNIN e ELLMAN, 1992).

A associação da pesquisa de produtos naturais para identificação do composto-protótipo com a preparação de coleções combinatórias para sua otimização ainda é bastante incipiente, mas tem sido crescentemente explorada. A preparação dessas coleções visa não somente a identificação de compostos mais potentes no mínimo espaço de tempo, mas também estabelecer algumas relações de estrutura-atividade, de forma a identificar os grupos farmacofóricos do composto-protótipo. A preparação de coleções de derivados, cujo padrão molecular já é encontrado em moléculas endógenas ou em fármacos comerciais, é de grande utilidade para a identificação de moléculas ativas frente a vários alvos biológicos (DIAS e CORRÊA, 2001). A

diversidade estrutural dos produtos naturais somada à capacidade da Química Combinatória de fornecer grande número de derivados em curto intervalo de tempo sugerem uma ação sinérgica na busca de novos fármacos. A síntese total dos compostos naturais e seus derivados e o seu uso como modelo para a construção de bibliotecas são as duas principais estratégias aplicadas para a integração da química combinatória com a química de produtos naturais (ABREU e BRANCO, 2003).

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito da aplicação da técnica combinatória no desenho e formação de bibliotecas de derivados de produtos naturais bioativos escolhidos como composto-protótipo. Na revisão de Abreu e Branco são ilustradas coleções combinatórias baseadas em produtos naturais de diversas origens biossintéticas, tais como flavonóides, alcalóides, terpenos, ácidos graxos, carboidratos entre outros (ABREU e BRANCO, 2003). Essas coleções combinatórias distinguem-se tanto com relação à complexidade das estruturas quanto nas finalidades farmacológicas, envolvendo a preparação de derivados relativamente simples como os da kramerixina (**18**), do balanolol (**21**), da endolactma V (**26**) e das cumarinas (**32**, **33**, **34**), até derivados mais complexos como os análogos as epotilonas A (**35**) e B e das sarcodictinas A (**38**) e B (**39**) (DIAS e CORRÊA, 2001).

Fecik e colaboradores prepararam uma biblioteca de 120 compostos derivados da kramerixina (**18**), uma neolignana isolada das espécies de *Krameria*. Esta coleção foi sintetizada a partir da reação de um cloreto ácido com fenóis em solução (FECIK et al, 1999). O anel furano da lignana é formado através da reação intramolecular de Wittig (figura 4). A avaliação da atividade antifúngica deste grupo de compostos permitiu a identificação de compostos mais potentes que a kramerixina.

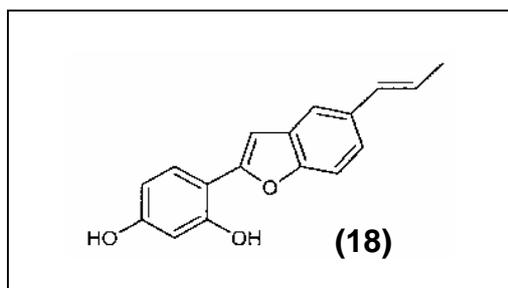


Figura 3: Estrutura química da kramerixina

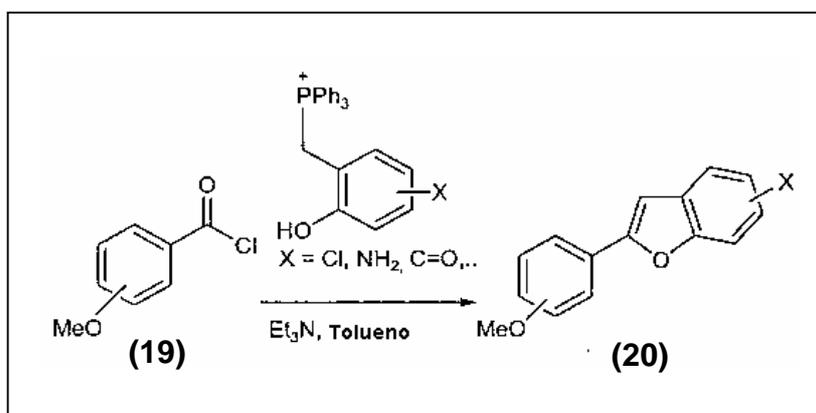


Figura 4: Biblioteca de compostos análogos da kramerixina

A coleção de compostos análogos do balanolol (**21**) foi sintetizada por Nielsen e Lyngso (NIELSEN e LYNGSO, 1996) a partir dos três blocos de construção (diácido derivado da benzofenona (**23**), amino álcool (**24**) e derivados do ácido benzóico (**25**) (figura 6) em fase sólida. Na síntese em fase sólida os composto preparados são ligados à uma resina polimérica, de onde são posteriormente removidos. O balanolol (**21**), um produto natural produzido pela espécie de fungos *Verticillium balanoides*, vem se destacando pela sua capacidade de inibir a proteína quinase C. Esta enzima é responsável por uma variedade de respostas celulares, incluindo a proliferação celular. A proteína quinase C, quando ativada (ligada ao ATP), está envolvida em diversas doenças tais como câncer, asma, inflamação, diabetes, entre outras (NICOLAOU et al., 1996).

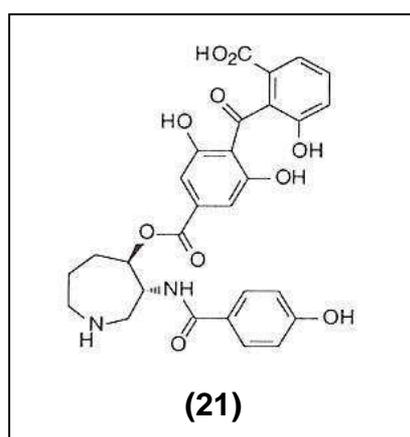


Figura 5: Estrutura química do balanolol

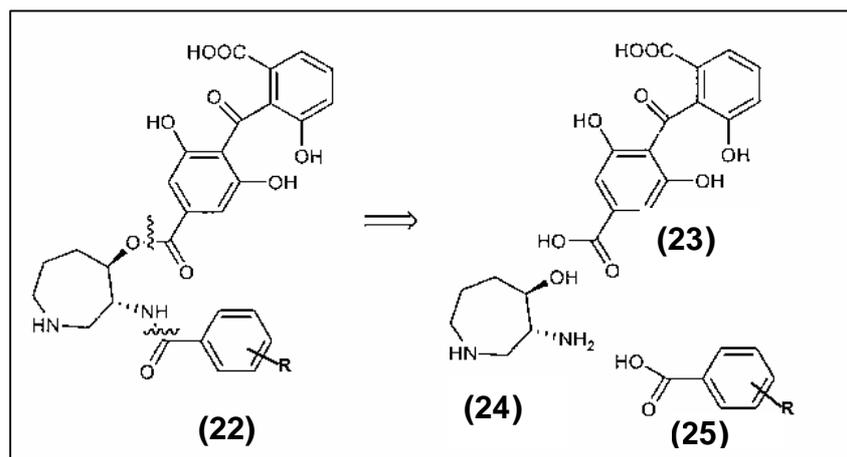


Figura 6: Biblioteca de compostos análogos do balanolol

Waldmann e colaboradores estabeleceram uma metodologia para a síntese em fase sólida de análogos da indolactama V (**26**), um alcalóide capaz de ativar a proteína quinase C (YANG et al, 1997). Baseando-se no conhecimento dos centros de interação da indolactama V com a proteína quinase C, uma coleção de análogos foi criada com uma diversidade de substituintes nas posições C-12, C-7 e N-13 indicadas na figura 7. A coleção de derivados da indolactama V foi sintetizada a partir do composto sintético (**27**) indicado na figura 8.

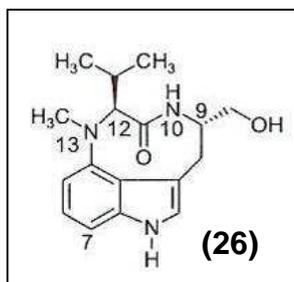


Figura 7: Estrutura química da indolactama V

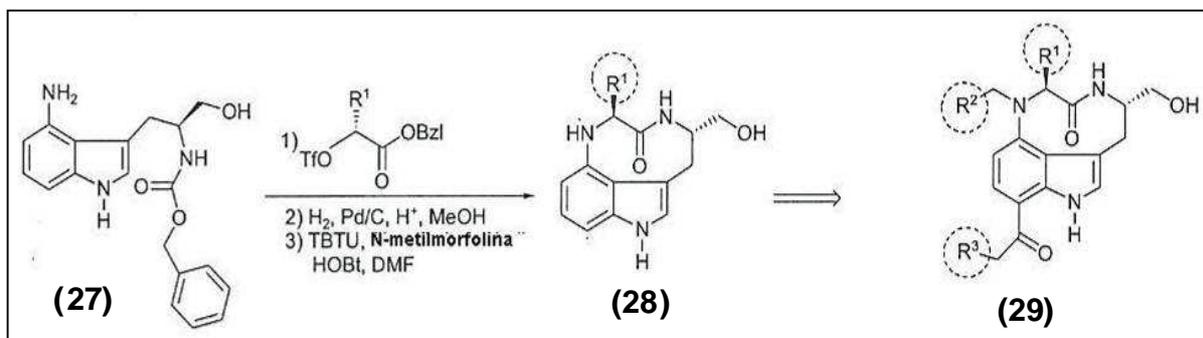


Figura 8: Biblioteca de compostos análogos da indolactama V

A coleção combinatória de cumarinas preparadas por Joel e colaboradores consistiu na reação de condensação de Knoevenagel de diferentes 2-hidroxibenzaldeídos **(30)** com o ácido de Meldrum (figura 9) ou malonato de etila, seguida pela reação de esterificação e/ou transesterificação ou bromação (JUNIOR et al, 2005). Desta forma, foi criada uma coleção contendo 38 cumarinas em solução. A avaliação farmacológica dos componentes desta coleção levou a identificação de compostos inibidores da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Esta enzima participa do caminho glicolítico do parasita *Trypanosoma cruzi*.

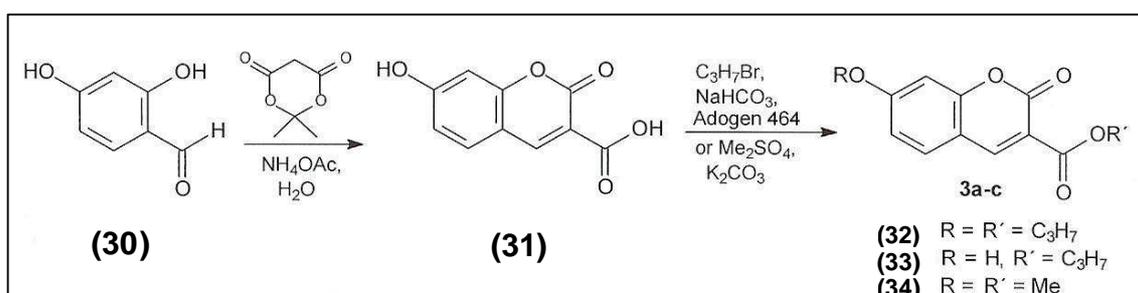


Figura 9: Coleção combinatória de cumarinas

A coleção combinatória de derivados da epotilona A **(35)**, um metabólito isolado de bactérias do gênero *Sorangium*, foi preparada por Nicolaou e colaboradores a partir de três blocos de construção R1, R2 e R3 (figura 11). Desta forma, dois tipos principais de macrociclos foram obtidos, cada um contendo 45 compostos com carbono nas configurações R e S (NICOLAOU, 1997). Em seguida, as epotilonas **(36)** **(37)** foram obtidas a partir da epoxidação destes derivados (figura 11) em solução. A avaliação farmacológica dos componentes desta coleção levou a identificação de nove compostos potenciais para o tratamento do câncer de mama e ovário.

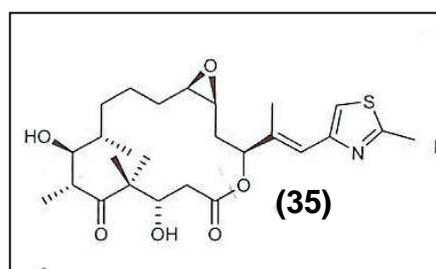


Figura 10: Estrutura química da epotilona A

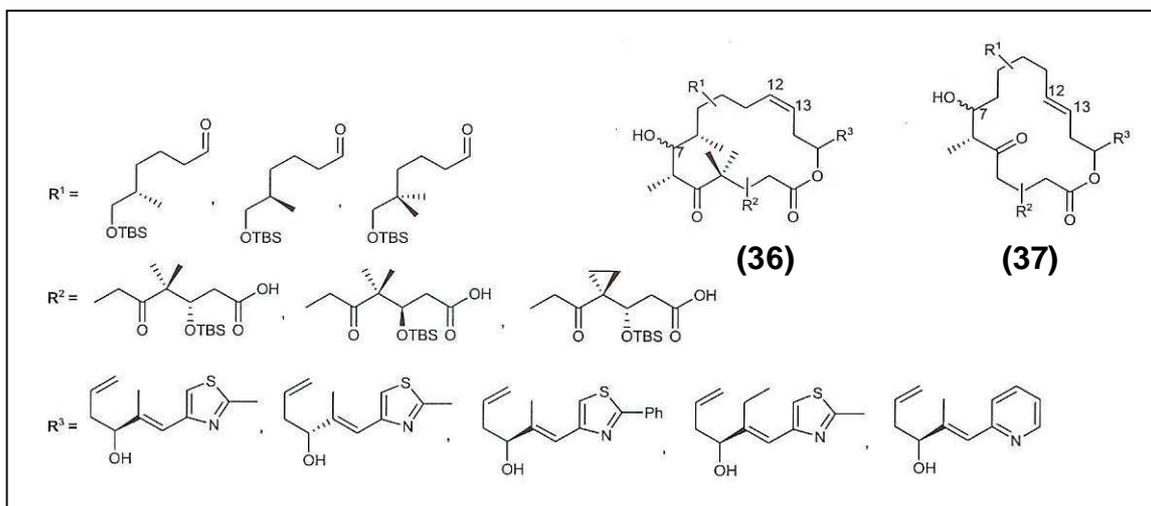


Figura 11: Biblioteca de compostos análogos da epitolone A

As sarcodictinas A (**38**) e B (**39**) foram isoladas de corais da espécie *Sarcodictyon roseum* e possuem potente ação antitumoral, apresentando modo de ação semelhante ao taxol (NICOLAOU et al, 1998). Na preparação da coleção combinatória de análogos desses diterpenóides foi empregado o intermediário (**40**) (figura 13) imobilizado em um polímero (representado por um círculo) e utilizadas as posições indicadas na sua estrutura para a geração de diversos derivados.

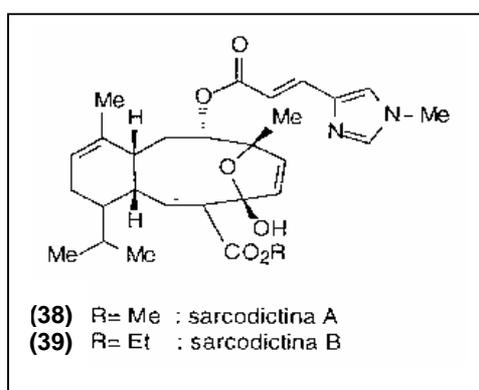


Figura 12: Estruturas químicas das sarcodictinas A e B

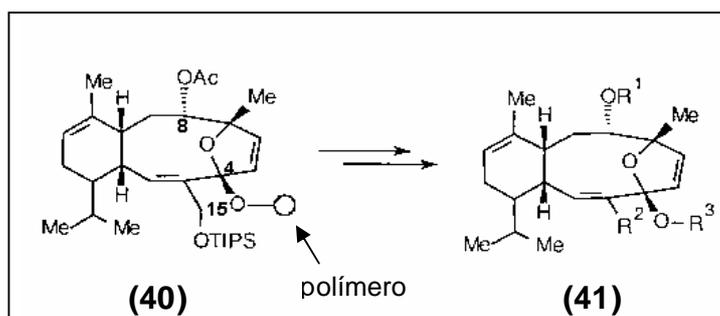


Figura 13: Coleção combinatória de compostos análogos das sarcodictinas

Na literatura podem ser encontrados diversos produtos naturais empregados como matéria-prima para a síntese de compostos bioativos. A síntese do paclitaxel (Taxol[®]) (**43**), um terpeno taxóide identificado nas cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), licenciado para uso terapêutico contra o câncer, foi realizada por Nicolaou e colaboradores a partir da acetilbacatina III (**42**)(figura 14). A acetilbacatina III é um terpeno derivado da acetilação da bacatina III, um taxóide encontrado nas folhas da árvore *Taxus baccata* (Taxaceae), representando um exemplo da importância dos produtos naturais na síntese de fármacos (NICOLAOU, DAÍ e GUY, 1994; SIMÕES et al, 2001; SOUZA, 2004).

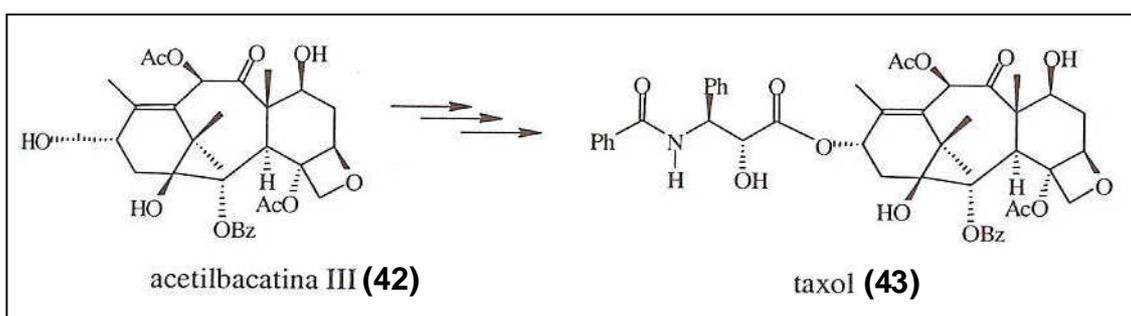


Figura 14: Síntese do taxol a partir da acetilbacatina III

Na busca por análogos taxóides mais eficazes, Xiao e colaboradores sintetizaram, em fase sólida, uma biblioteca composta por mais de 400 compostos taxóides a partir da acetilbacatina III (**42**) (figura 15) (XIAO, PARANDOOSH e NOVA, 1997)

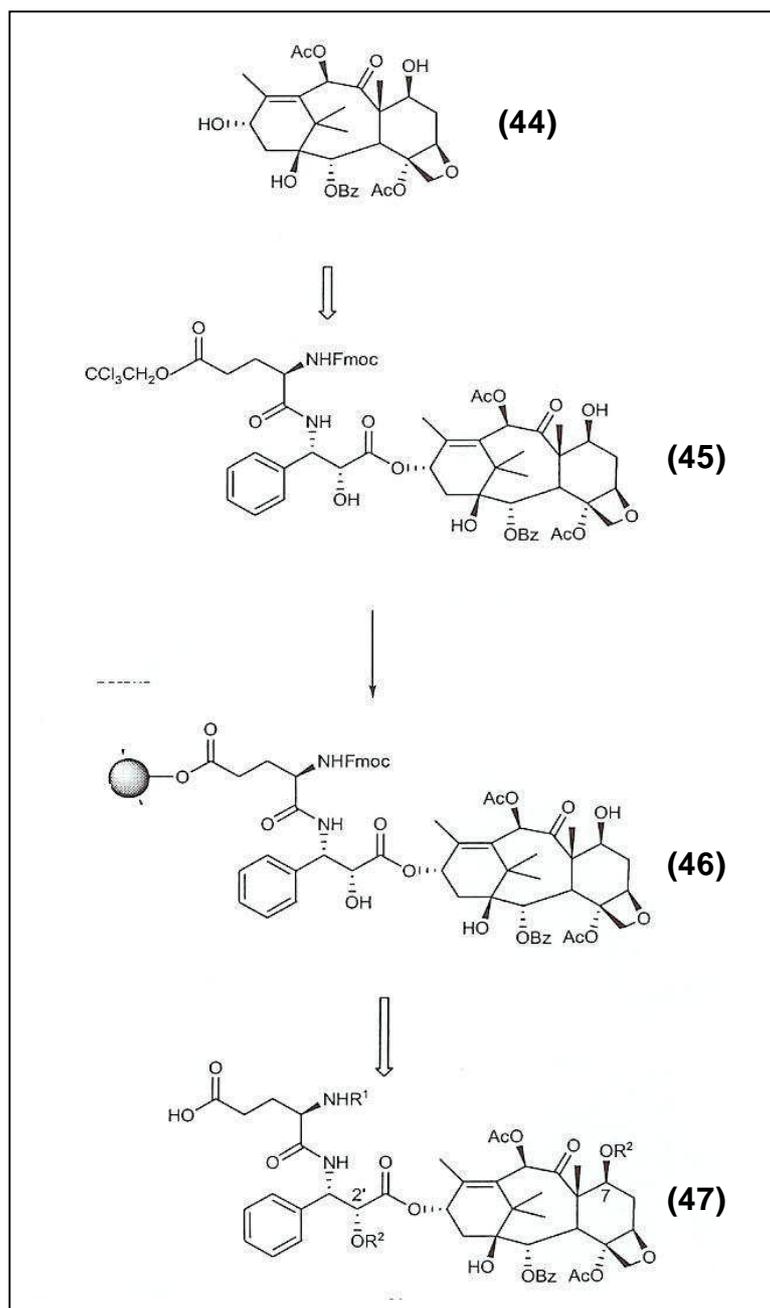


Figura 15: Coleção combinatória de compostos análogos do taxol

Um dos mais antigos trabalhos na área de modificação combinatória de produto natural descreve a derivatização de alcalóides indólicos ioimbina **(48)** e rauwolfscina **(49)** (figura 16) encontrados no gênero *Rauwolfia* (ATUEGBU et al, 1996). Estes alcalóides são agentes anti-hipertensivos, anti-arrítmicos e antagonistas dos receptores adrenérgicos, o que os torna compostos atrativos para a síntese de bibliotecas (figura 16). A coleção combinatória desses

alcalóides, preparada por Atuegbu e colaboradores, foi obtida a partir da ligação da carboxila do anel E do alcalóide a um grupamento amino do aminoácido ligado à resina, levando ao intermediário **(50)** (figura 16). Em seguida, a reação do intermediário com uma variedade de ácidos carboxílicos levou a formação da coleção de análogos do alcalóide indólico (ATUEGBU et al, 1996).

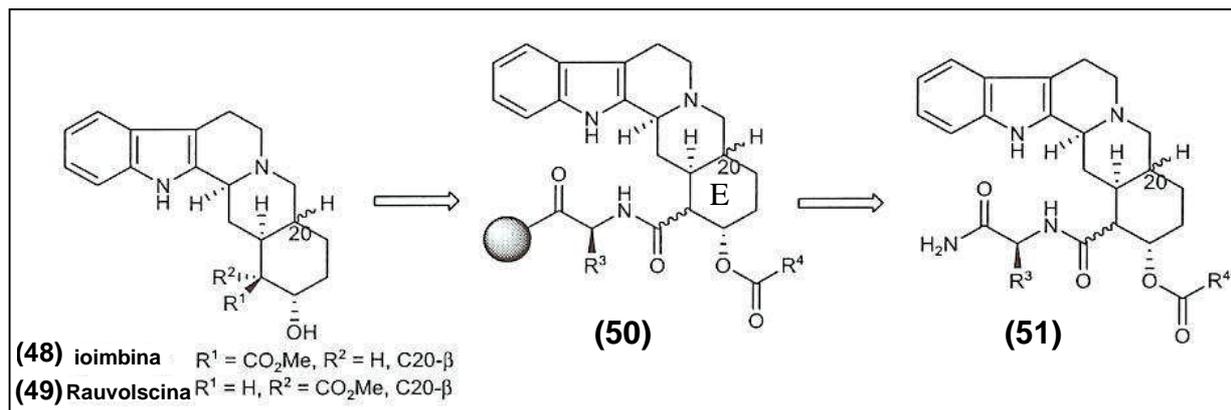


Figura 16: Estruturas químicas dos alcalóides indólicos ioimbina e rauvolscina e dos seus compostos análogos

A extensão da abordagem combinatória aos produtos naturais bioativos vem sendo realizada de forma bastante promissora no Brasil. O país, com a grandeza do seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, é o berço natural para investigação de plantas com potencial medicinal e para o desenvolvimento de novos medicamentos: fármacos, fitoterápicos e fitofármacos (PINTO et al, 2002). A espécie vegetal brasileira *Carpotroche brasiliensis*, popularmente conhecida como sapucainha, árvore pertencente à família Flacourtiaceae, foi bastante utilizada no tratamento da lepra e outras infecções cutâneas. No óleo das sementes desta planta estão presentes ácidos graxos ciclopentênicos, uma matéria-prima valiosa para a síntese de compostos biologicamente ativos.

Um grupo de pesquisa, motivado pelo princípio de que os produtos naturais abundantes da flora brasileira possam ser utilizados como unidades estruturais de partida de agentes terapêuticos mais promissores, iniciou em 1978, no NPPN-UFRJ, um programa de pesquisa objetivando a síntese estereosseletiva de prostaglandinas da série desoxi-11 PGE₂ **(53)**, **(54)**, **(55)** e

(56) (BARREIRO e GOMES, 1982; GOMES e BARREIRO, 1983), utilizando como matéria-prima o ácido hidnocárpico (52), o ácido graxo ciclopentênico mais abundante no óleo da sapucainha (figura 17).

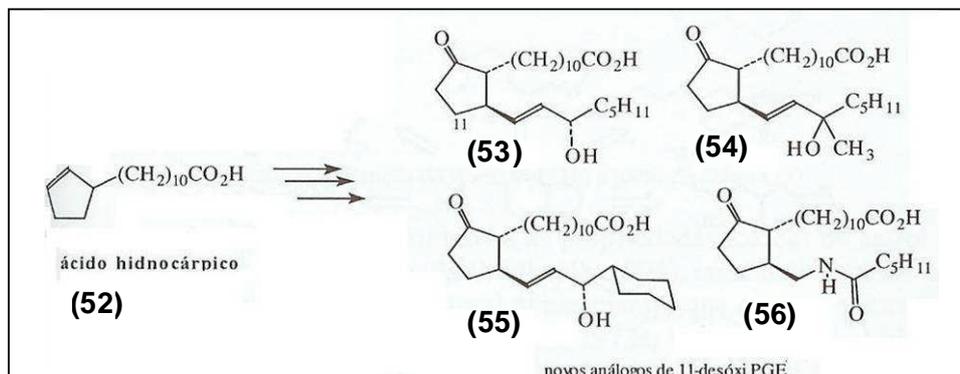


Figura 17: Síntese de análogos de 11-desóxi-PGE a partir do ácido hidnocárpico

Essa classe de prostaglandinas desempenha um importante papel fisiológico, estando diretamente envolvida em processos inflamatórios, regeneração de tecidos, respostas imunológicas e propriedades broncodilatadoras. Devido à pronunciada disponibilidade desta classe de compostos, diversos derivados sintéticos baseados no seu esqueleto carbônico foram preparados para os mais diferentes alvos biológicos (SIMÕES, 2001). Janda e colaboradores relataram uma estratégia para a preparação de derivados de prostaglandinas E₂(PGE₂) utilizando três blocos de construção (57), (58) e (59) para a síntese em fase líquida (CHEN e JANDA, 1997) (figura 18).

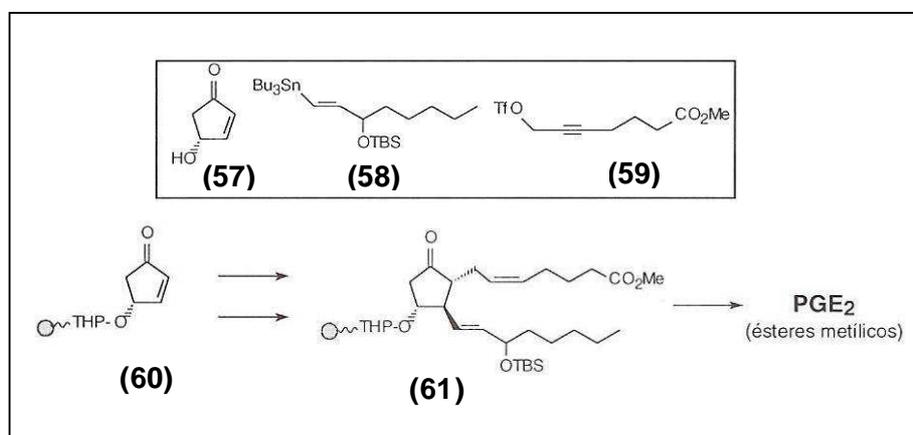


Figura 18: Síntese de derivados de prostaglandina E₂

Desta forma, o emprego de produtos naturais na síntese de substâncias de interesse farmacêutico compreende uma estratégia importante para a obtenção de novos compostos bioativos, desde que o planejamento molecular seja adequadamente realizado, representando uma alternativa atraente para a descoberta de novos protótipos, que otimizados, viabilizarão a identificação de nova e interessante entidade química bioativa.

1.1. A família Flacourtiaceae

As Flacurtiáceas são arbustos ou árvores medianas encontradas principalmente nas florestas tropicais asiáticas, na Índia, Sri Lanka, Senegal, península Indo–China, Filipinas, Indonésia e Brasil.

As Flacurtiáceas foram tratadas em sua plenitude por Hutchinson (HUTCHINSON, 1967), que dividiu esta família em 10 sub-famílias e 90 gêneros com cerca de 1284 espécies (tabela 1). Pode-se verificar que o tratamento de Hutchinson difere daquele dado por Gilg (tabela 2) (GILG, 1925 *apud* SPENCER e SEIGLER, 1985). Hutchinson, diferentemente de Gilg, distanciou a subfamília Pangieae da Oncobeeae e excluiu a sub-família Paropsiae pertencente à família Passifloraceae.

Graças à grande quantidade de pesquisas desenvolvidas pelos botânicos Sleume, Bosser e Lemke (LEMKE, 1983), novas espécies estão sendo introduzidas nesta família (tabelas 1 e 2).

Tabela 1: O gênero e as tribos (subfamílias) da Família Flacourtiaceae, de acordo com a classificação de Hutchinson.		Tabela 2: O gênero, as subfamílias e as tribos da família Flacourtiaceae de acordo com Gilg.	
<p>Tribo 1. Berberidopsidae</p> <p>1. Streptothamnus 2. Berberisopsis 3. Erythrospermus 4. Camptostylus 5. Ahemia 6. Dasylepis 7. Scottellia 8. Rawsonia</p> <p>Tribo 2. Oncobae</p> <p>9. Carpotroche 10. Dendrostigma 11. Mayna 12. Xylothea 13. Oncoba 14. Caloncoba 15. Lindackeria 16. Poggea 17. Grandidiera 18. Pterodendron 19. Prockiopsis 20. Buchnerodendron</p> <p>Tribo 3. Scolopieae</p> <p>21. Scolopia 22. Sabournaea 23. Batholomaea 24. Hemiscolopia 25. Pseudoscolopia 26. Dioncophyllum 27. Phyllobotryon 28. Phylloclinium 29. Mocquersia</p> <p>Tribo 4. Banarea</p> <p>30. Banera 31. Pineda 32. Trimeria 33. Asteropeia</p> <p>Tribo 5. Homalieae</p> <p>34. Dissomeria 35. Calantica 36. Homalium 37. Nisa 38. Byrsanthus 39. Homaliopsis 40. Gerrardina</p> <p>Tribo 6. Pangieae</p> <p>41. Chlorocarpa 42. Hydnocarpus 43. Taraktogenos 44. Goethalsia</p>	<p>45. Eleutherandra 46. Gynocardia 47. Pangium 48. Trichadenia 49. Baleyoxyton 50. Scphocalyx 51. Ryparosa 52. Kiggelaria</p> <p>Tribo 7. Flacourtieae</p> <p>53. Olmediella 54. Bennetiodendron 55. Flacourtia 56. Dovyalis 57. Neopringlea 58. Tisonia 59. Aphloia 60. Eichlerodendron 61. Azara 62. Ludia 63. Xylosma 64. Guya 65. Poliothyrsis 66. Carriera 67. Itoa 68. Synandrina 69. Idesia 70. Priamosia</p> <p>Tribo 8. Caseariae</p> <p>71. Casearia 72. Gossypiospermum 73. Laetia 74. Hecatostemon 75. Ryania 76. Zuelania 77. Osmelia 78. Pseudosmelia 79. Ophiobotrys 80. Lunania 81. Euceraea 82. Tetrathylacium 83. Bivinia 84. Samyda 85. Neoptychocarpus 86. Abatia 87. Aphaerema</p> <p>Tribo 9. Alsateae</p> <p>88. Alzatea</p> <p>Tribo 10. Bembicieae</p> <p>89. Bembicia 90. Bembiciopsis</p>	<p>1. Oncobae</p> <p>1. Rawsonia 2. Dasylepis 3. Scottellia 4. Berberidopsis 5. Pyramidocarpus 6. Ahemia 7. Erythrospermum 8. Camptostylus 9. Poggea 10. Grandidiera 11. Paraphyadathe 12. Oncoba 13. Xylothea 14. Caloncoba 15. Lindackeria 16. Mayna 17. Carpotroche 18. Buchnerodendron 19. Prockiopsis</p> <p>2. Pangieae</p> <p>A. Hydnocarpinae</p> <p>20. Hydnocarpus 21. Scaphocalyx 22. Trichadenia 23. Gynocardia 24. Pangium 25. Ryparosa</p> <p>B. Kiggelariinae</p> <p>26. Kiggelaria</p> <p>3. Paropsieae</p> <p>27. Soyauxia 28. Hounea 29. Paropsia 30. Smeathmannia 31. Paropsiopsis 32. Barteria</p> <p>4. Abatieae</p> <p>33. Abatia 34. Aphaerema</p> <p>5. Trichostephaneae</p> <p>35. Trichostephanus</p> <p>6. Scolopieae</p> <p>A. Scolopiinae</p> <p>36. Scolopia 37. Pseudoscolopia 38. Streptothamnus</p> <p>B. Dioncophyllinae</p> <p>39. Dioncophyllum</p> <p>C. Prockiinae</p> <p>40. Prockia</p>	<p>41. Hasseltia 42. Banara 43. Pineda</p> <p>7. Homalieae</p> <p>44. Homaliopsis 45. Byrsanthus 46. Gerrardina 47. Homalium 48. Calantica 49. Trimeria 50. Dissomeria</p> <p>8. Phyllobotryeae</p> <p>51. Phyllobotryum 52. Phylloclinium 53. Mocquersia</p> <p>9. Flacourtieae</p> <p>A. Flacourtiinae</p> <p>54. Eichlerodendron 55. Xylosma 56. Guya 57. Azara 58. Ludia 59. Priamosia 60. Tisonia 61. Neumannia 62. Flacourtia 63. Dovyalis 64. Olmediella</p> <p>B. Idesiinae</p> <p>65. Bennetia 66. Quadrasia 67. Idesia 68. Poliothyrsis 69. Carriera 70. Itoa</p> <p>10. Caseariae</p> <p>71. Luania 72. Arechavaletaia 73. Tetrathylacium 74. Samyda 75. Laetia 76. Stapfiella 77. Euceraea 78. Ophiobotrys 79. Osmelia 80. Patrisia 81. Hecatostemon 82. Zuelania 83. Casearea</p> <p>11. Bembicieae</p> <p>84. Bembicia</p>

Atualmente são conhecidas muitas espécies pertencentes à família Flacourtiaceae, situando-se a maioria no gênero *Hydnocarpus* (sub-família Pangeae). Um outro gênero, *Oncoba* (sub-família Oncobae), aparece com muitas espécies, sendo a *O. echinata* (Oliver) a mais cultivada na África. Um terceiro gênero é o *Carpotroche* (sub-família Oncobae) e entre as espécies brasileiras mais conhecidas estão *C. brasiliensis* Endl., *C. amazonica* Mart., *C. grandiflora* Spruce, *C. longifolia* Benth, *C. intergrifolia* Kuhlmann; do gênero *Lindackeria* (sub-família Oncobae) destacam-se as espécies *L. latifolia* Benth, *L. pauciflora* Benth, *L. ovata* Benth, e do gênero *Mayna* (sub-família Oncobae); *M. odorata* Aubl; além de outros gêneros pertencentes às sub-famílias Casearieae e Flacourtieae (DA SILVA, 1926; LOPES, 1982). Todas estas espécies se destacam pela presença de óleo na semente de seus frutos. Este óleo, mais conhecido como óleo de chaulmugra, foi considerado por muitos anos o único remédio com alguma ação curativa para o tratamento dos casos de lepra. Desde então, as plantas produtoras deste óleo passaram a ser cultivadas em várias regiões do mundo. A identificação posterior da espécie *C. brasiliensis* fez com que essa flacurtiácea se tornasse a principal fornecedora do óleo no Brasil. Assim, o óleo de chaulmugra, extraído de várias espécies de flacurtiáceas, atravessou toda a Idade Média só sendo abolido em 1940, com o surgimento das sulfas.

O óleo de chaulmugra apresenta em sua composição diversos ácidos ciclopentênicos, aos quais foram dados os nomes de ácido chaulmúgrico **(66)**, hidnocárpico **(65)** e górlico **(68)**.

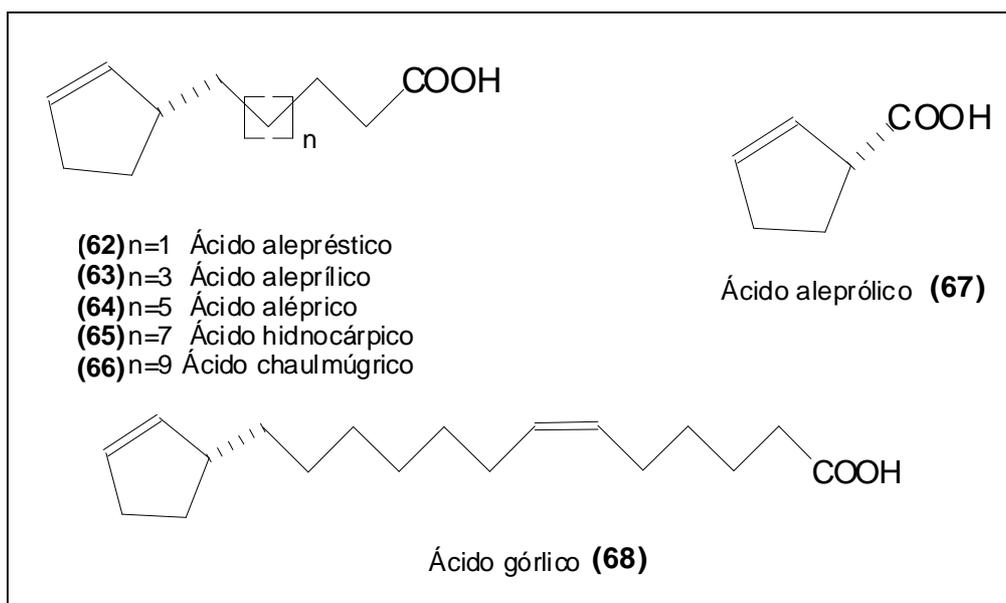


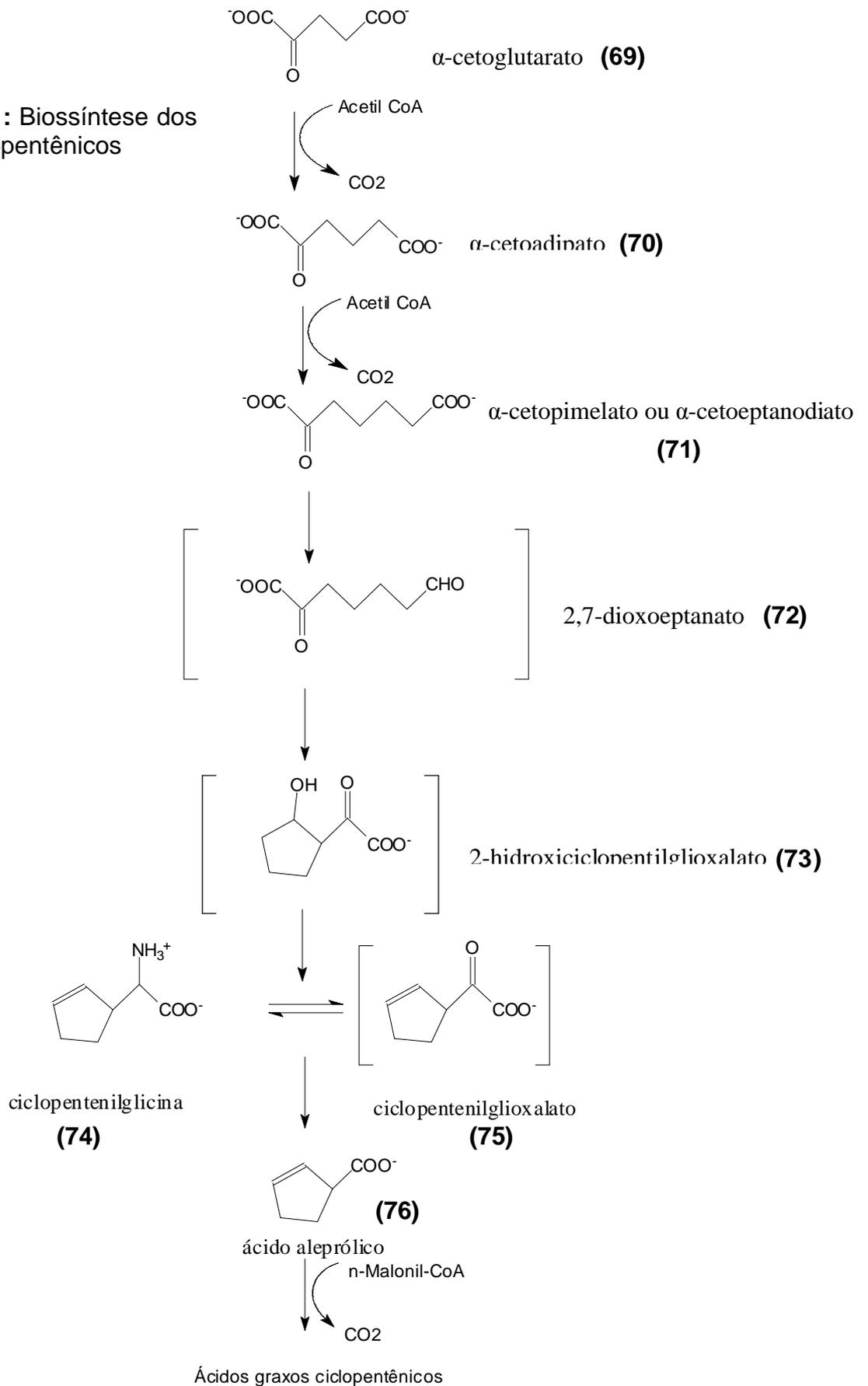
Figura 19: Estrutura química dos ácidos ciclopentênicos

A evolução de um caminho biossintético para a produção dessas estruturas ciclopentênicas representa uma característica taxonômica dentro da família Flacourtiaceae. Apenas quatro outras famílias produzem tais compostos, representadas por Passifloraceae, Turneraceae, Malesherbiaceae e Caricaceae (SPENCER e SEIGLER, 1985).

1.1.1. Biossíntese dos ácidos ciclopentênicos

Todos os ácidos graxos ciclopentênicos existentes na natureza evidenciam um número par de átomos de carbono. Alguns experimentos mostraram que os ácidos graxos ciclopentênicos surgem a partir do alongamento da cadeia do ácido alepróico (76), possivelmente obtido a partir da ciclopentenilglicina (74). O esquema 1 mostra como a biossíntese dos ácidos graxos ciclopentênicos é proposta no momento. As substâncias entre colchetes não foram identificadas com clareza (ABDEL-MOETY, 1981; REHFELDT, SCHULTE e SPENER, 1980).

Esquema 1: Biossíntese dos ácidos ciclopentênicos



O composto α -cetopimelato (**71**) seria obtido pelo alongamento da cadeia de α -cetoglutarato (**69**) por duas unidades de acetil-CoA. Após a redução de α -cetopimelato (**71**) para a formação de um aldeído, uma reação de condensação aldólica intramolecular pode ocorrer para a formação de 2-hidroxiciclopentilglioxalato (**73**). Este, por sua vez, pode sofrer uma desidratação formando o ciclopentenilglioxalato. O ácido aleprólico é então formado a partir da ação de enzimas transaminases sobre ciclopentenilglioxalato (REHFELDT e SPENER, 1980).

Outra característica importante da família Flacourtiaceae é a presença de substâncias cianogênicas, ainda que estas não estejam presentes em todas as espécies. Além da importância taxonômica, a existência destes metabólitos possui um papel importante na defesa contra predadores. Quando as folhas são quebradas, ocorre uma reação enzimática sobre um substrato cianogênico, liberando HCN. Este fenômeno é observado em mais de 20 espécies dentre as sub-famílias já mencionadas (SPENCER e SEIGLER, 1985; THOMSEN e BRIMER, 1997)

O glicosídeo cianogênico mais largamente encontrado na família Flacourtiaceae, a ginocardina (**77**), foi isolado e identificado nas sementes e folhas das espécies de *Gynocardia odorata* L., *Pangium edule* Reinw e *Carpotroche brasiliensis* (SPENCER e SEIGLER, 1985).

Spencer & Seigler estudaram a distribuição de glicosídios cianogênicos em 550 espécies desta família e verificaram que a distribuição destes contribui para o estabelecimento das relações filogenéticas dentro da família (SPENCER e SEIGLER, 1985). A maioria das espécies de flacourtiáceas contêm glicosídeos ciclopentanóides com a hidroxila na posição *cis* ao grupo glucopiranosila, tais como, ginocardina (**77**), epivolkenina (**78**) e tarakitofilina (**79**), o que a diferencia da família *Passifloraceae*. (JAROSZEWSKI e OLAFSDITTIR, 1987).

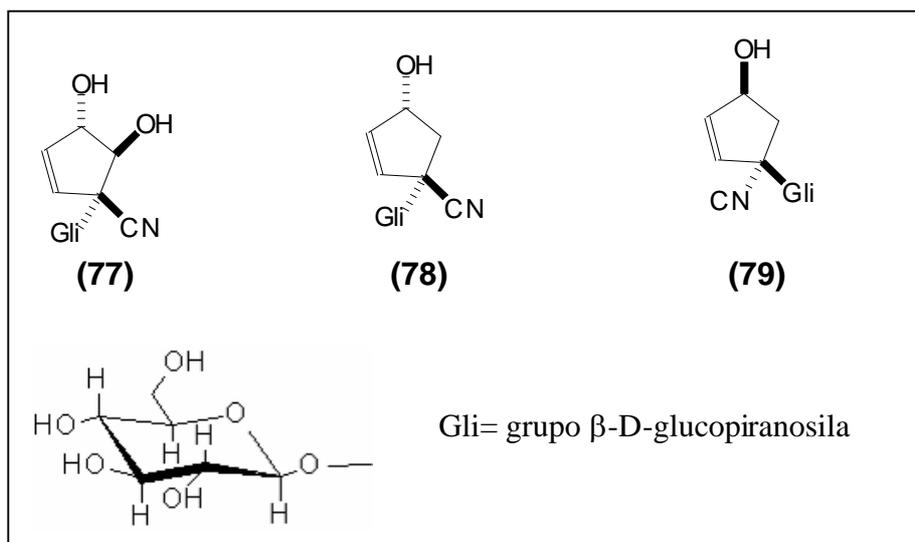


Figura 20: Estrutura química dos glicosídeos cianogênicos

1.2. Histórico do Óleo de Chaulmugra

A primeira referência ao emprego de flacurtiáceas oleaginosas no tratamento da lepra é do domínio da lenda. Diz a lenda pré-budista que o rei Rama, da Birmânia, abandonou o trono e foi para o interior da floresta para esconder a sua moléstia incurável. Ali, alimentando-se das folhas e frutos da árvore kalaw, curou-se a si próprio e a princesa Piya, que encontrou na selva, segregada também pela doença (ARAÚJO, 2005).

Em 1771, no Tesouro da Medicina, uma enciclopédia médica “Makhzan-Adwiya” o médico persa Muhammed-Husein cita o óleo “Chawul mungri” ou “Chaulmugri” para designar o *Hydnocarpus kurzii*. A palavra migrou para o ocidente com o nome chaulmoogra (ou chaulmugra), sendo incluída em 1898 na 4ª edição da British Pharmacopeia e na 1ª Farmacopéia Venezuelana (ABDEL-MOETY e MANGOLD, 1981).

Em 1854, na Índia, o cirurgião britânico F. J. Mouat usou um óleo chamado de óleo de chaulmugra, obtido das florestas do sudeste da Ásia, para tratar leproso (MOUAT, 1854 *apud* ABDEL-MOETY, 1981).

Na metade do século XIX, a chaulmugroterapia abriu caminho em todo o ocidente, com a introdução do óleo na medicina, mas foi apenas a partir de 1900 que se iniciou a investigação das suas propriedades terapêuticas e da sua composição química (LOPES, 1982).

No Brasil, Theodoro Peckolt, farmacêutico alemão, que se radicou no Rio de Janeiro em 1848, foi o primeiro a sugerir o óleo obtido da chaulmugra brasileira, *Carpotroche brasiliensis*, para o tratamento de leprosos. Ele foi pioneiro na obtenção de ácidos a partir do óleo das sementes desta Flacourtiaceae, em 1869, treze anos antes que John Moss os isolasse do óleo de uma chaulmugra indiana (SOUZA, 1935 *apud* COLE e CARDOSO, 1938 a).

Em 1904-1905 F. B. Power e colaboradores isolaram os ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico (figura 19), do óleo de chaulmugra, obtido de sementes de *H. kurzii* (King), *H. wightiana* e *H. anthelmintica*. Em 1907, eles estabeleceram as suas fórmulas estruturais (POWER e GORNALL, 1904 *apud* ABDEL-MOETY, 1981; POWER e BARROWCLIF, 1905; POWER e BARROWCLIF, 1907 *apud* ABDEL-MOETY, 1981).

Em 1921, J. Carvalho Del Vecchio preparou no Brasil os ésteres etílicos dos ácidos graxos do óleo de *C. brasiliensis*, a fim de que Eduardo Rabelo os experimentasse no Hospital dos Lázaros no Rio de Janeiro (comunicação feita à sociedade Médica cirúrgica do Rio de Janeiro) (DA SILVA, 1926). Com o progresso sobre o conhecimento da composição química do óleo de chaulmugra e o fracionamento de seus ácidos, a terapêutica dos lepromatosos ganhava novas armas com a produção de derivados destes ácidos.

A estrutura do ácido chaulmúgrico foi confirmada no ano de 1925 por R.L. Shriner e R. Adams (SHRINER e ADAMS, 1925).

Em 1926, Antenor Machado relatou a descoberta de dois novos compostos presentes no óleo de *C. brasiliensis*, chamando-os de ácidos carpotróchico e carpotrochínico (MACHADO, 1926 *apud* COLE & CARDOSO, 1938b). Nesse mesmo ano, Da Silva mostrou que estes ácidos faziam parte de uma mistura cujos constituintes principais eram os ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico (DA SILVA, 1926).

Em 1928, André e Jouatte isolaram um componente do óleo da Flacourtiaceae *O. echinata*, que recebeu o nome de ácido górlico, por ser derivado do “óleo gorli”, como os nativos chamavam o óleo obtido da *Oncoba echinata* (ANDRÉ e JOUATTE, 1928). Paget, em 1937, trabalhando na Inglaterra com o óleo das sementes do *C. brasiliensis* (PAGET, 1937) e Cole e Cardoso, em 1938, trabalhando com o óleo das sementes de *C. brasiliensis* e *O. echinata* (COLE e CARDOSO, 1938a; COLE e CARDOSO 1938b; COLE e

CARDOSO, 1938c) obtiveram o mesmo constituinte mencionado por André e Jouatte em 1928, o ácido górrico. Embora não o obtivesse puro, Paget foi o primeiro a propor sua estrutura química e a mencionar a sua atividade ótica em 1937 (PAGET, 1937).

Em 1939, Cole e Cardoso (COLE e CARDOSO, 1939) relataram a presença de outros quatro componentes destes óleos, homólogos dos ácidos já encontrados, os quais ocorriam em pequenas percentagens, sendo denominados ácido aléprico, ácido aleprílico, ácido alepréstico e ácido aleprólico (figura 19).

1.2.1. A espécie *Carpotroche brasiliensis* Endl

A espécie da família Flacourtiaceae em estudo no presente trabalho é a *Carpotroche brasiliensis* (Endl). Trata-se de uma árvore grande chegando a atingir até 20 metros de altura e 30 cm de diâmetro (figura 21). Fornece madeira parda escura com manchas pretas; os frutos fornecem polpa, a qual submetida à fermentação dá bebida de sabor agradável, porém raramente aproveitada. O fruto é grande, carnudo, com até 10 cm de comprimento e 12 de diâmetro, alas grossas e membranosas, contendo de 80 a 90 sementes envoltas em polpa esbranquiçada ou amarelada, adocicada, comestível para diversos animais, principalmente roedores. Das sementes do fruto se extrai um óleo, chamado por alguns autores de óleo de “carpotroche” ou de “sapucainha”, equivalente ao óleo “chaulmugra” em sua composição e atividade terapêutica. O óleo tem função inseticida, depilatória, parasiticida, sendo eficaz no combate à caspa, aos piolhos e a todas manifestações herpéticas (PIO CORRÊA, 1984).

As folhas são pecioladas, obovado-oblongas, agudas no ápice e levemente atenuadas na base atingindo até 18 cm de comprimento. São finamente serradas, pubescentes enquanto novas e nervadas na parte inferior. Flores polígamas, róseas, grandes, com as sépalas mais compridas do que as pétalas (PIO CORRÊA, 1984). Esta espécie floresce quase o ano todo, predominantemente de junho a setembro e seus frutos amadurecem de agosto a setembro (LORENZI, 2002).

Esta árvore é originária das florestas montanhosas dos seguintes estados: Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, São Paulo e Piauí e dependendo da região recebe diversos nomes vulgares: Sapucainha (o mais conhecido), Ruchuchú, Canudo de pito, Fruto de macaco, Fruto de cotia, Pau de cachimbo, Fruta de babado, Papo de anjo e Pau de lepra (PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002).

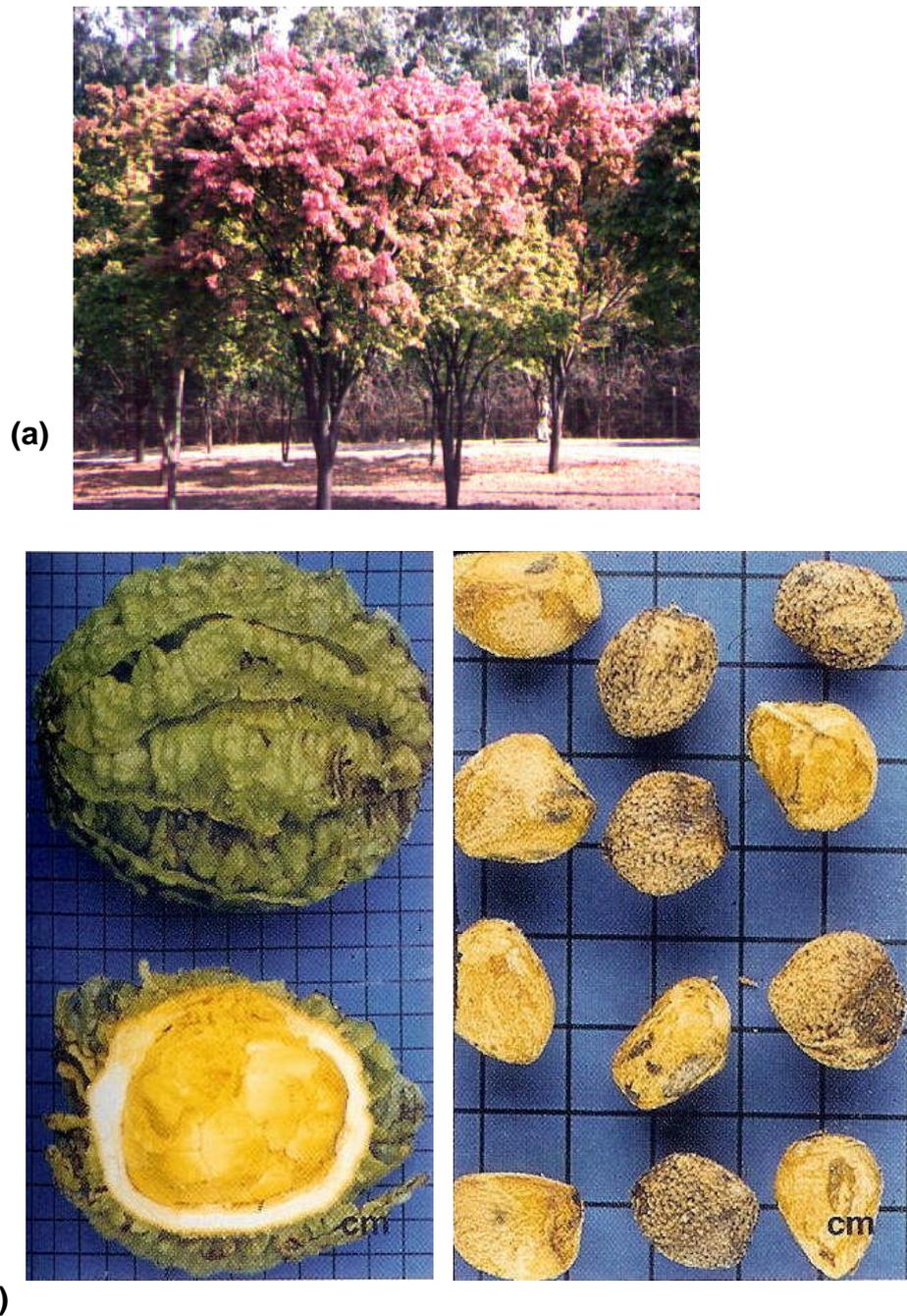


Figura 21: (a) Espécie *Carpotroche brasiliensis* (fonte: www.tomdaservas.com.br/sapucaia.html) (b) Frutos e sementes da espécie *Carpotroche brasiliensis* (fonte: LORENZI, 2002)

1.2.2. Histórico do óleo de *Carpotroche brasiliensis* (Flacourtiaceae)

Entre 1861 a 1869, Peckolt fez seus principais estudos sobre o *C. brasiliensis* (Endlicher). O estudo completo foi publicado na Alemanha, em 1868, no *Zeitschrift der allg. Österr. Apotheker- Vereines* (DA SILVA, 1926).

Em 1861, nas Coleções de Farmacognosia e Química enviada à Exposição Nacional, Peckolt apresentou três produtos de sua análise, descrevendo o fruto constituído de “60 a 96 sementes, envolvidas numa polpa doce com cheiro de maçã”. Das sementes ele extraiu um óleo amarelado que servia para azeite de lampião, julgando que poderia ser ainda usado para temperar comidas, carecendo de maiores observações sobre seus efeitos medicinais (ARAÚJO, 1946). Deste óleo foi isolada uma fração, à qual deu o nome de ácido carpotróchico.

No catálogo explicativo da Coleção de Farmacognosia e Química Orgânica enviada à Exposição Nacional de 1866, Peckolt relata os resultados da análise do óleo de *C. brasiliensis*, em cuja composição química encontrou, além dos ácidos oléico e palmítico, outros ainda não conhecidos, que denominou de ácidos carpotróchico, carpotrochínico e carpotrolênico, bem como uma substância cristalina, a carpotrochina. Do óleo, ele isolou ainda um ácido graxo cristalino ao qual deu o nome de ácido estéreocarpotróchico, referindo-se possivelmente ao ainda desconhecido ácido hidnocárpico (SANTOS, PINTO e ALENCASTRO, 1998). A análise do óleo de *C. brasiliensis* feita por Peckolt em 1866 foi a primeira, no mundo, a ser publicada sobre os óleos de Chaulmugra (SANTOS, PINTO e ALENCASTRO, 1998). Segundo Da Silva, todos os ácidos obtidos por Peckolt eram misturas, em proporções variáveis, dos vários ácidos existentes no óleo da sapucainha.

Em 1868, nas suas “Análises da Matéria Médica Brasileira” ao descrever melhor os frutos de *C. brasiliensis*, Peckolt recomenda fortemente o uso desse óleo como sucedâneo do óleo de chaulmugra oriundo da Índia (SANTOS, PINTO e ALENCASTRO, 1998).

Em 1911, Pio Corrêa ressaltou as virtudes parasiticidas e anti-lepróticas dessa planta pela primeira vez nos “Archivos Brasileiros de Medicina” (PIO CORRÊA, 1984). Ao mesmo tempo em que ressaltava essas propriedades, Pio Corrêa ofereceu ao Dr. Gustavo Riedel frutos de *C. brasiliensis*, de cujas sementes foi extraído o óleo, que esse ilustre médico e outros colegas ensaiaram em enfermos do Hospício Nacional de Alienados do Rio de Janeiro. Foi essa a primeira aplicação no Brasil do óleo de *C. brasiliensis* como sucedâneo do óleo de Chaulmugra. Regressando de uma viagem que fez à Índia, em 1915, Pio Corrêa insistiu na utilização do óleo, mas aqui ninguém se importou, embora as revistas estrangeiras tudo divulgassem (PIO CORRÊA, 1984).

Vários cientistas brasileiros continuaram trabalhando com o *C. brasiliensis* e, em 1924, Antenor Machado identificou os ácidos descritos por Peckolt conservando-lhes os nomes e determinando-lhes as fórmulas (MACHADO, 1926 *apud* COLE & CARDOSO, 1938b).

Em 1926, Da Silva conseguiu isolar do óleo de *C. brasiliensis*, por destilação fracionada, os ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico (DA SILVA, 1926).

Em 1937, Cole e Cardoso fizeram a análise mais completa do óleo de *C. brasiliensis*, obtendo as seguintes percentagens de ácidos graxos: ácido chaulmúgrico 24,4%, ácido hidnocárpico 45,5%, ácido palmítico 6,6%, ácido górrico 15,4% e ácido oléico 6,3% (COLE e CARDOSO, 1938 b; POSSOLO, 1945). Nesta análise, Cole e Cardoso utilizaram a técnica de destilação fracionada dos ésteres etílicos seguido da cristalização dos constituintes do óleo.

Os ácidos ciclopentênicos podem atingir proporções de até 90% dos ácidos graxos totais de diferentes óleos de Chaulmugra. Spener & Mangold relatam um aumento da proporção desses ácidos durante o estágio de maturação das sementes (SPENER e MANGOLD, 1974). Na fração lipídica estão também presentes o ácido palmítico, esteárico e outros ácidos graxos homólogos de cadeia linear (COLE e CARDOSO, 1939; SPENER e MANGOLD, 1974). Para uma simples comparação, na tabela 3 estão presentes as proporções dos três ácidos graxos mais importantes em diferentes óleos de sementes de plantas da família Flacourtiaceae. Estes ácidos naturais são opticamente ativos, devido à presença de um átomo de carbono assimétrico no

sistema cíclico, cabendo a Peckolt os primeiros relatos desta descoberta (PAGET, 1937). Em 1955, Mislow e Steinberg estabeleceram a configuração absoluta deste centro assimétrico, estabelecendo a configuração R para todos os ácidos da série (MISLOW e STEINBERG, 1955).

O processo de obtenção dos ácidos graxos ciclopentênicos, descrito há 40 anos atrás, empregando as técnicas de destilação fracionada dos ésteres seguido da cristalização, ainda é o método de escolha para o isolamento em escala preparativa (ABDEL-MOETY, 1981; DA SILVA, 1926).

Ácidos	<i>H. anthelmintica</i> (%)	<i>H. kurzii</i> (%)	<i>H. wightiana</i> (%)	<i>C. echinata</i> (%)	<i>C. brasiliensis</i> (%)
Hidnocáptico	67,8	34,9	48,7	-	45,5
Chaulmúgrico	8,7	22,5	27,0	74,9	24,4
Górlico	14,0	22,6	12,2	14,7	15,4

Tabela 3: Composição química dos ácidos ciclopentênicos de algumas espécies da família Flacourtiaceae (ABDEL-MOETY, 1981).

Cole e Cardoso observaram que, embora o óleo de *C. brasiliensis* se mantivesse estável por um período de um ano, as sementes se deterioravam rapidamente. Após este período, o óleo das sementes velhas era extremamente irritante (COLE e CARDOSO, 1938 b). Paget anunciou que esta irritação estaria associada a presença dos chamados ácidos tárlicos (“tarry-acids”), numa concentração de 9% (PAGET, 1937). Cole e Cardoso relataram que esses ácidos seriam formados a partir da decomposição do ácido górlico, considerado mais instável em relação aos ácidos chaulmúgrico e hidnocáptico (COLE e CARDOSO, 1938 b).

Os produtos de oxidação dos ácidos ciclopentênicos foram apresentados no trabalho de Paget como hidroxí (**80**) e ceto ácidos (**81**). Barrowcliff e Power encontraram o ácido γ -ceto-heptadecanodióico (**82**) entre os produtos de oxidação do ácido chaulmúgrico.

Ao mesmo tempo em que as estruturas dos ácidos eram elucidadas e relatadas na literatura, alguns pesquisadores passaram a se preocupar com a síntese parcial ou total destas substâncias devido a sua importância na terapêutica.

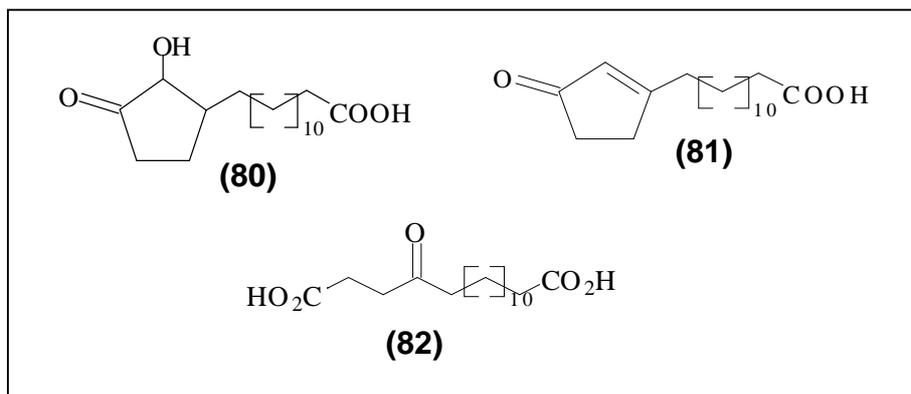


Figura 22: Estrutura química dos produtos de oxidação descritos nos trabalhos de Paget e Barrowcliff.

1.2.3. Síntese de ácidos ciclopentênicos

Na literatura estão descritos alguns procedimentos para a síntese parcial ou total das estruturas ciclopentênicas encontradas no óleo de Chaulmugra. Partindo do ácido hidnocárpico, Stanley e Adams, em 1929, relataram a síntese do ácido chaulmúgrico (STANLEY e ADAMS, 1929). Em 1927, Perkins e Cruz descreveram a síntese total do ácido chaulmúgrico na forma do seu racemato (PERKINS e CRUZ, 1927) e, posteriormente, em 1941, Bokil e Nargund (BOKIL e NARGUND, 1941 *apud* LOPES, 1982) além de Diasper e Smith, descreveram a síntese do ácido hidnocárpico, também na forma de racemato (DIASPER e SMITH, 1948 *apud* LOPES, 1982)

Em 1955, Mislow e Steinberg relataram a síntese total do ácido chaulmúgrico opticamente puro e estabeleceram a configuração absoluta do seu único centro assimétrico, bem como para seus homólogos, tais como os ácidos hinocárpico, górrico e demais ácidos da série (MISLOW e STEINBERG, 1955), os quais apresentaram configuração R .

1.2.4. Propriedades Farmacológicas e Terapêuticas do óleo da semente de *C. brasiliensis*

As propriedades farmacológicas e terapêuticas do óleo de *C. brasiliensis* foram estudadas inicialmente por Peckolt, entre 1860 e 1869. Esse farmacêutico estudou as propriedades físicas, químicas e terapêuticas do óleo de *C. brasiliensis*, comparando-o ao genuíno óleo de chaulmugra. Os resultados físicos e químicos obtidos com *C. brasiliensis* foram bastante próximos aos observados com o óleo de chaulmugra (PIO CORRÊA, 1984; DA SILVA, 1926). Da Silva afirmou que “dada a identidade da composição química do óleo de sapucainha com o de chaulmugra, a sua ação terapêutica, logicamente, só pode ser a mesma” (DA SILVA, 1926). A atividade contra os bacilos ácido-resistentes, observado com o óleo do *C. brasiliensis*, indicou fortemente o uso desse óleo, em substituição ao de chaulmugra, no tratamento da lepra (DA SILVA, 1926).

As atividades parasiticida e anti-leprótica de *C. brasiliensis* foram citadas por Pio Corrêa, nos “Archivos Brasileiros de Medicina”, em 1911 (PIO CORRÊA, 1984)

Em 1926, Dias da Silva avaliou o perfil farmacológico do óleo de *C. brasiliensis*, utilizando diferentes vias de administração e formas farmacêuticas, encontrando as mesmas características observadas para o óleo de chaulmugra relatadas nos trabalhos de Read (DA SILVA, 1926). O óleo de *C. brasiliensis* é mal tolerado pela via oral, provocando, freqüentemente, anorexia, dores gástricas, náuseas e vômitos. Foi citado que as injeções intramusculares também não eram bem toleradas e as endovenosas ocasionavam, às vezes, reações de certa gravidade, como acessos de tosse, opressão respiratória, com acentuada dispnéia e cianose e no fim de algumas horas, hipertermia (39-40°C). Esta última modalidade de administração teve muitos adeptos e era considerada eficaz na regressão de lesões paucibacilares, embora seu mecanismo de ação não fosse conhecido. Os ácidos graxos livres também foram empregados, porém, foi observado que a forma mais ativa e melhor tolerada eram os ésteres etílicos dos ácidos graxos, os quais foram pela

primeira vez preparados no Rio de Janeiro por Da Silva, para serem utilizados no Hospital dos Lázaros, desta cidade. Neste mesmo ano, Da Silva concluiu ainda que a ação específica de *C. brasiliensis* contra o bacilo da lepra realiza-se à custa de seus ácidos graxos não saturados, isto é, dos ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico (DA SILVA, 1926).

Os ésteres metílicos derivados dos ácidos ciclopentênicos também foram usados por via oral. Os ésteres benzílicos correspondentes foram comercializados pela Bayer sob o nome de “Antileprol-Bayer” no tratamento da lepra (WAGNER-JAUREGG, 1942 *apud* ABDEL-MOETY, 1981). Inúmeros outros derivados, como os cinamatos, foram usados em exames quimioterápicos (BURSKCHKIES, 1943). Os laboratórios Granado lançaram produtos à base dos ésteres etílicos dos ácidos graxos do óleo de sapucainha, acrescidos dos princípios ativos do óleo de fígado de bacalhau, de cânfora e de timol (DA SILVA, 1926) (figura 23).

É SEMPRE PREJUDICIAL
preferir "SIMILARES" ao legítimo

PROTARGOL "BAYER"
Verdadeiros "similares" não existem, pois todos os proteinatos de prata são meras IMITAÇÕES que não se podem comparar com o producto "Bayer" valiosíssimo no seu effecto therapeutico.

Receitem sempre Protargol "Bayer".

ANTILEPROL "BAYER"
ether ethylico de oleo de chalmoogra purificado
INJEÇÕES LIQUIDO PEROLAS
Tratamento racional da lepra.
reço comodo,

ANTILEBRINA
Medicação anti-leprotica à base do milenário específico
OLEO DE CHAULMOOGRA

Componentes	g	Por ampola	
		2 cc.	5 cc.
Esteres de Oleo de Chaulmoogra . . .	30	1,00	4,00
Cálcioformio	0,5	0,10	0,25
Cafores	0,5	0,10	0,25
Timol	0,2	0,04	0,10
Vitamina "D" cristallizada: (40 milhões U. I. por grama)	0,001	3,000	20,000
Oleo concentr. em Vitamina "A": (500.000 U. I. por grama)	0,2	2,000	5,000
Oleo de Amendoim purificado . . .	q. s. p.	2 cc.	5 cc.

A "Antilebrina" é a medicação recomendada pelos especialistas do mal de Hansen

INSTITUTO CIENTIFICO SÃO JORGE S. A.
SEDE — RIO DE JANEIRO — RUA SENADOR DANTAS, 41

AGENCIAS

BELO HORIZONTE SÃO PAULO PORTO ALEGRE
R. da Bahia, 321 Rua Aurora, 271 Av. 10 Novembro, 339

Figura 23: Produtos à base do óleo de chaulmugra comercializados no tratamento da lepra (fonte: ARAÚJO,2005)

É importante destacar os trabalhos de Louis Levy que revelaram a atividade bacteriostática do ácido hidnocárpico. Este ácido inibiu a multiplicação, *in vitro*, de 38 das 47 linhagens de 16 espécies de bactérias (JACOBSEN, HERMAN & LEVY, 1973). Os sais de sódio dos ácidos graxos do

óleo chaulmugra e o ácido chaulmúgrico também foram capazes de inibir a multiplicação de *M. leprae* em pata de ratos injetados com este bacilo (LEVY, 1975).

A partir de 1940, as sulfas e outros quimioterápicos como a clofazimina, estreptomicina, rifampicina e dapsona suprimiram o uso de preparados com óleo de chaulmugra e de *C. brasiliensis*.

1.3. Ácidos graxos ciclopentênicos e prostaglandinas

Os ácidos graxos ciclopentênicos encontrados no óleo de *C. brasiliensis*, a chaulmugra brasileira, têm estrutura química relacionada às prostaglandinas, eicosanóides envolvidos em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos (ex: processos inflamatórios).

As prostaglandinas são ácidos carboxílicos insaturados com 20 carbonos, com anel de cinco membros (figura 24). As famílias de prostaglandinas, leucotrienos e outros compostos relacionados são chamados de eicosanóides porque são derivados de ácidos graxos essenciais de 20 carbonos que possuem três, quatro ou cinco ligações duplas em sua estrutura, tais como, o ácido dihomo- γ -linolênico, o ácido araquidônico (**83**) e o ácido 5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenóico.

A síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, principal fonte dos eicosanóides, ocorre em um processo com várias etapas (figura 24). Na etapa inicial, um estímulo físico provocado pela perturbação da membrana celular causa um influxo de Ca^{2+} , o que ativa a fosfolipase A2, que por sua vez, hidrolisa a ligação éster do fosfolípídeo da membrana com a liberação do araquidonato. Uma vez liberado, o araquidonato é metabolizado rapidamente a produtos oxidados por diversas enzimas, incluindo a ciclooxigenase, lipooxigenases ou citocromo P450. A síntese das prostaglandinas acontece em etapas consecutivas sob a ação de enzimas microssomais (figura 24). A primeira enzima da via sintética é a endoperóxido sintase, também chamada de ciclooxigenase (COX). Existem duas isoformas desta enzima, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A primeira é constitutiva e está

presente em muitas células. A COX-2 não está normalmente presente, mas pode ser induzida por fatores séricos, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (GOODMAN et al, 2003).

Os produtos formados pela COX, PGG₂ **(84)** e PGH₂ **(85)** são quimicamente instáveis, podendo ser transformados enzimaticamente (pelas enzimas sintetases PGIS, TxAS, PGES, PGFS, PGDS) em uma variedade de produtos, incluindo prostaciclina (PGI) **(89)**, tromboxano (TXA) **(86)**, e prostaglandinas (PGE **(88)**, PGF **(90)** e PGD **(87)**) (figura 24).

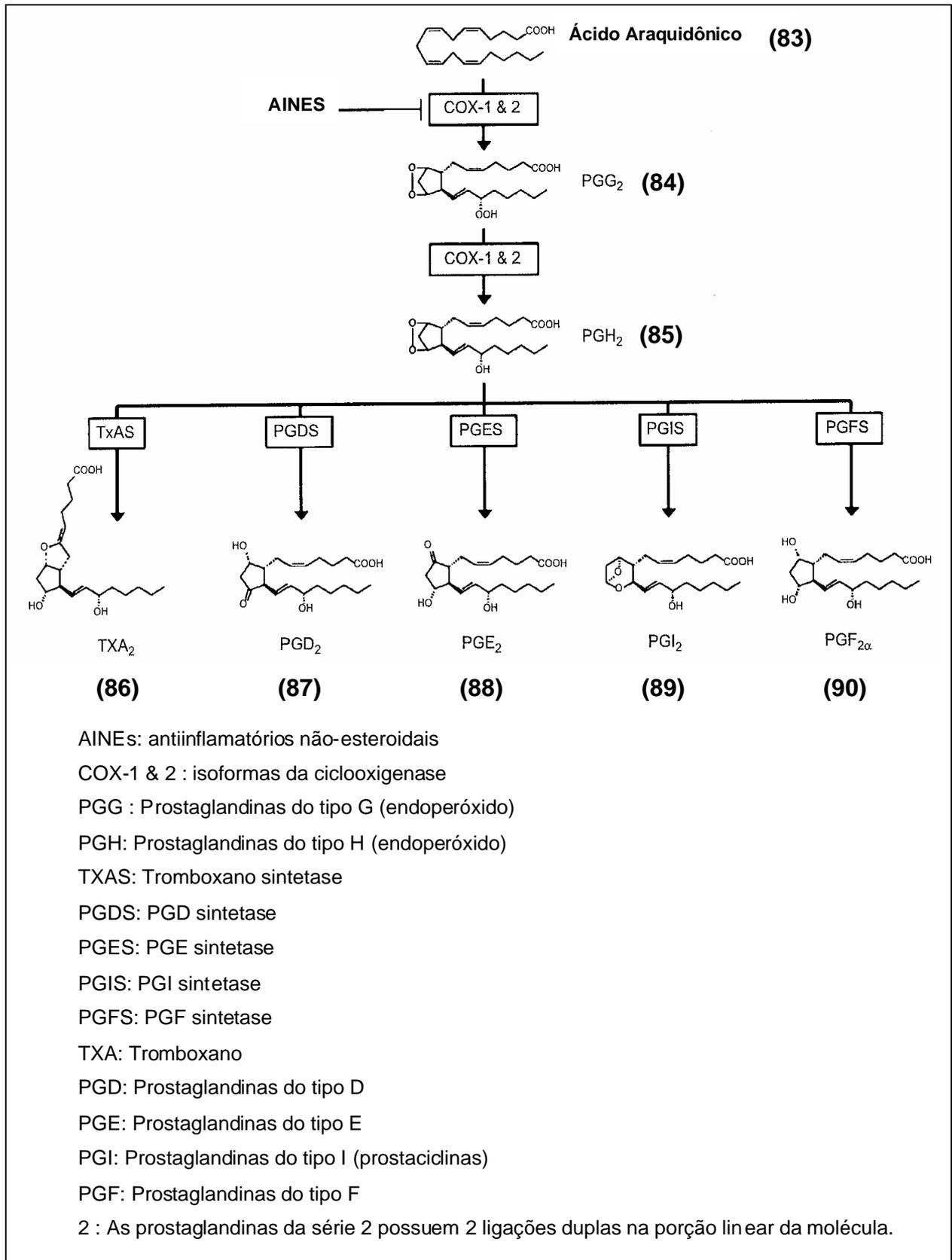


Figura 24: Biossíntese das prostaglandinas. (FONTE: HATA & BREYER, 2004)

Análogos dos precursores naturais de ácidos graxos podem servir como inibidores competitivos da formação de prostaglandinas e produtos de lipoxigenases (GOODMAN et al, 2003).

As drogas antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas são um grupo de compostos heterogêneos, não quimicamente relacionados (embora a maioria sejam ácidos orgânicos), que compartilham certas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo dessas drogas é a Aspirina e os compostos são referidos como relacionados à Aspirina (“Aspirin-like”); mais freqüentemente esses compostos são chamados de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs). O principal mecanismo de ação desses AINEs é a inibição da cicloxigenase (COX), a enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas e outros autacóides relacionados (GOODMAN et al, 2003). As COX-1 e 2 diferem na sensibilidade à inibição por certas drogas antiinflamatórias. Esta observação levou ao desenvolvimento de agentes clinicamente úteis que inibem seletivamente a COX-2. Estas drogas apresentam vantagens quando comparadas com agentes antiinflamatórios não esteroidais convencionais não seletivos, desde que a COX-2 é a ciclooxigenase predominante nos sítios da inflamação, mas não nos sítios trato gastrointestinal. Inibidores da COX-2 são antiinflamatórios e não apresentam os efeitos adversos dos inibidores não seletivos da COX (GOODMAN et al, 2003).

Relacionando os ácidos ciclopentênicos de *C. brasiliensis*, prostaglandinas e processos inflamatórios originados por estas, é possível correlacionar o uso desses ácidos no alívio de sintomas da lepra. A Lepra (ou Hanseníase) é uma infecção bacteriana crônica que envolve a pele, nervos e outros tecidos. Esta infecção é causada pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria capaz de se adaptar ao parasitismo intracelular e sobreviver incubada por um longo período de tempo, até 20 anos, antes que seus efeitos sejam observados (COVEY, 2001). Os principais estados imunológicos mediados por reações inflamatórias, características da Lepra, podem ser de dois tipos: a reação reversa (reação do tipo 1) e o eritema nodoso hansênico (reação do tipo 2). A reação reversa se caracteriza pela reativação de lesões pré-existentes com sinais de inflamação aguda, tais como eritema, edema e hipersensibilidade; aparecimento de lesões novas com características semelhantes às anteriores; espessamento de nervos

periféricos, acompanhados de dor espontânea ou à compressão; distúrbios sistêmicos como, por exemplo, mal estar geral e, eventualmente, febre (VALENTINI et al, 1999). Na reação do tipo II (eritema nodoso hansênico) ocorre o aparecimento de nódulos dérmicos ou subcutâneos eritematosos, quentes, móveis, por vezes dolorosos; lesões eritematosas com formação de vesículas, bolhas, evoluindo muitas vezes para ulcerações; sintomas sistêmicos tais como: febre, perda de peso, etc; espessamento, dor e sensibilidade de nervos (VALENTINI et al, 1999). Comum a ambos os tipos de reação são dor e descamação nas laterais da infecção e estas reações são caracterizadas pelo aumento da atividade inflamatória nos nervos e lesão da pele que são reguladas pela síntese de citocinas e TNF- α (VALENTINI et al, 1999).

As prostaglandinas do tipo E₂ (PGE₂) também possuem um papel importante no resultado destas manifestações inflamatórias. A PGE₂ é um poderoso vasodilatador e atua de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. É esta ação dilatadora combinada sobre as arteríolas pré-capilares que contribui para o eritema e o aumento do fluxo do sangue nas áreas de inflamação aguda. Estas estruturas em si, não produzem dor, mas potencializam o efeito da bradicinina ao sensibilizar as fibras nervosas C aferentes (VALENTINI et al, 1999).

Como já foi citado acima, o quadro de evolução da hanseníase, tratada ou não, pode acarretar certas reações imunológicas, que algumas vezes produzem febre e inflamação da pele. Na tentativa de aliviar as manifestações cutâneas produzidas pela doença de Hansen, o óleo de *C. brasiliensis* foi bastante utilizado topicamente. Com isso, surgiu o interesse por parte de alguns pesquisadores na análise do óleo bem como de seus derivados oriundos da reação de auto-oxidação. A presença de produtos oxidados poderia estar relacionada com a atividade observada. (ABDEL-MOETY, 1981).

Sabendo-se que análogos dos precursores naturais de ácidos graxos podem servir como inibidores competitivos da formação de prostaglandinas e produtos de lipoxigenases, que a maioria dos AINEs são ácidos orgânicos de classes variadas e, que os ácidos de *C. brasiliensis* são estruturalmente

relacionados as prostaglandinas, estes ácidos podem ser avaliados para uma possível ação antiinflamatória.

2. Objetivos

O uso do óleo de chaulmugra no tratamento da hanseníase e a semelhança estrutural dos seus constituintes com as prostaglandinas, despertaram o interesse fitoquímico para a investigação da sua composição química e da sua atividade farmacológica. Por ter sido utilizado topicamente no tratamento da hanseníase, a atividade deste óleo diante das reações hansênicas poderia também estar relacionada com a presença dos produtos da auto-oxidação dos seus constituintes.

Diante destas informações, esta pesquisa se propôs a relatar os estudos relativos a:

- Determinação da composição química da fração ácida do óleo da semente da espécie de chaulmugra brasileira *C. brasiliensis*
- Investigação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva da fração ácida do óleo
- Criação de coleções de moléculas estruturalmente relacionadas a partir da oxidação dos ácidos graxos presentes no óleo para serem testadas quanto à atividade antiinflamatória
- Investigação da estabilidade do óleo e dos seus produtos de degradação.

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Equipamentos utilizados:

Balança analítica: Fabricante: Ohaus - Explorer /Número de Série: E1381119191032 /Modelo: E12140

Evaporador rotatório e bombas de médio Vácuo:

Para evaporação dos solventes a pressão reduzida (trompa d'água) utilizou-se evaporadores rotatórios modelos MA120 (nº 0301215). Como fonte de aquecimento foi utilizado banho térmico com temperatura controlada. A remoção de resíduos de solventes foram feitas utilizando um sistema de médio vácuo (bomba de óleo) a uma pressão de 1 torr.

3.1.2. Métodos Espectroscópicos

Espectrofotômetro de infravermelho

Foi utilizado espectrofotômetro Nicolet Magna IR 760, com pastilhas comprimidas em brometo de potássio anidro e/ou filmes em células de brometo de potássio. Os valores para as absorções foram referidos em número de ondas (cm^{-1}) e os espectros foram calibrados com filmes de poliestireno de 0,05 mm de espessura nas frequências de absorções: 3030, 2925; 1601; 1493; 757 e 698 cm^{-1} .

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C

Nas análises por RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) foi empregado um aparelho Brüker modelo AC-300. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado, com tetrametilsilano (TMS) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram referidos em unidades adimensionais (δ), representado como parte por milhão da frequência aplicada.

3.1.3. Métodos Cromatográficos

Cromatógrafo à gás de alta resolução acoplado a espectrômetro de massas

Foi utilizado o aparelho Hewlett-Packard 6890 Series GC System acoplado a um espectrômetro de Massas do tipo Hewlett-Packard 5973 Mass Selective Detector, controlados por computador através do software Standard Chem Station G1701AA versão 3 (1996). Coluna DB5MS com 40 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme.

Condições Cromatográficas:

Método CB-1: Temperatura do injetor: 270 °C sem divisão de fluxo, gás de arraste: He (velocidade linear 50 mL/min). Programação do forno: temperatura inicial de 45 °C (1 minuto), seguida da primeira rampa de aquecimento de 30°C/ minuto até 130 °C (3 minutos) e uma segunda rampa de 10°C/ minuto até 300 °C (5 minutos). Volume injetado 1 μL .

Método CB-2: Temperatura do injetor: 270 °C sem divisão de fluxo, gás de arraste: He (velocidade linear 50 mL/min). Programação do forno: temperatura inicial de 45 °C (1 minuto), seguida da primeira rampa de aquecimento de 30°C/ minuto até 130 °C (3 minutos) e uma segunda rampa de 12°C/ minuto até 300 °C (5 minutos). Volume injetado 1 μL .

Método CB-3: Temperatura do injetor: 270 °C sem divisão de fluxo, gás de arraste: He (velocidade linear 50 mL/min). Programação do forno: temperatura inicial de 60 °C (1 minuto), seguida da primeira rampa de aquecimento de 30°C/minuto até 130 °C (3 minutos) e uma segunda rampa de 12°C/minuto até 300 °C (5 minutos). Volume injetado 1 µL.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV. Os fragmentos dos espectros de massas foram descritos como relação unidade de massa atômica (uma) e a carga dos mesmos (m/z). Dados do espectrômetro de massas: Temperatura da fonte de íons: 250°C, temperatura da linha de transferência 300 °C, aquisição dos dados: varredura linear ("scan"), analisador de massas: quadrupolo.

Cromatógrafo à gás de alta resolução acoplado ao detector de ionização de chama

Foi utilizado o cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 acoplado ao integrador Hewlett-Packard 3396A, com injetor tipo "split/splitless" (290 °C) sem divisão de fluxo, coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme) e detector por ionização de chama (290 °C). As vazões dos gases foram de 2 mL/min para o Hélio como gás de arraste, e de 450, 40 e 50 mL/min para ar, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente, no detector. Temperatura inicial de 60 °C, seguida de taxa de aquecimento de 18 °C/min até 310 °C. Volume de injeção de 2,0 µL.

3.1.4. Solventes e Reagentes

Solventes:

Diclorometano P.A., clorofórmio P.A., hexano P.A., acetato de etila P.A. e metanol P.A. foram fornecidos pela Vetec e Tedia (Brasil).

Isopropanol P.A. (Tedia), etanol 96% (Vetec) e éter etílico P.A. (Tedia) foram utilizados como recebidos.

O tetraidrofurano foi previamente destilado.

Água destilada.

Reagentes:

Ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB)- Marca e lote não identificados.

Hidróxido de sódio (NaOH) P.A., Merck, Lote: 702038 (art. 6498).

Hidróxido de potássio (KOH): lentilhas P.A., VETEC, Lote:991445.

Sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), VETEC, Lote: 031341.

Trifluoreto de boro (BF₃)- Marca e lote não identificados.

Boroidreto de sódio (NaBH₄), VETEC, Lote:7492

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 % v/v, Merck, Lote: K25382087/828.

Sal de diazald (N-metil-N-nitroso tolueno – p-sulfonamida)- Marca e lote não identificados.

Iodo (I₂) P.A. : Quimibrás Industries Lote: 10112.

Solução de Tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 50%: Control Tec. Lote: 97IS0721

Dissulfeto de dimetila ((CH₃)₂S₂) 99%, Aldrich, Lote : 471569

Ácido mirístico 99 %- Merck , Lote VV 455478 .

Padrões:

Elaidato de metila (*trans*-9-Octadecenoato de metila) (figura 25)- Merck (Art. 9758). Lote: 946VV45158 (99%)

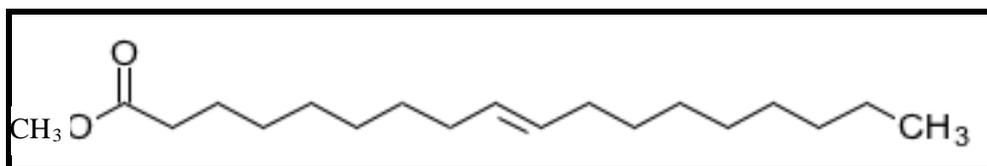


Figura 25 : Estrutura do elaidato de metila

Heptadecanoato de metila- Merck (Art. 9754). Lote: VV401954 (99%)

3.2. Trabalho fitoquímico realizado com as sementes do fruto de *Carpotroche brasiliensis* (Endl.)

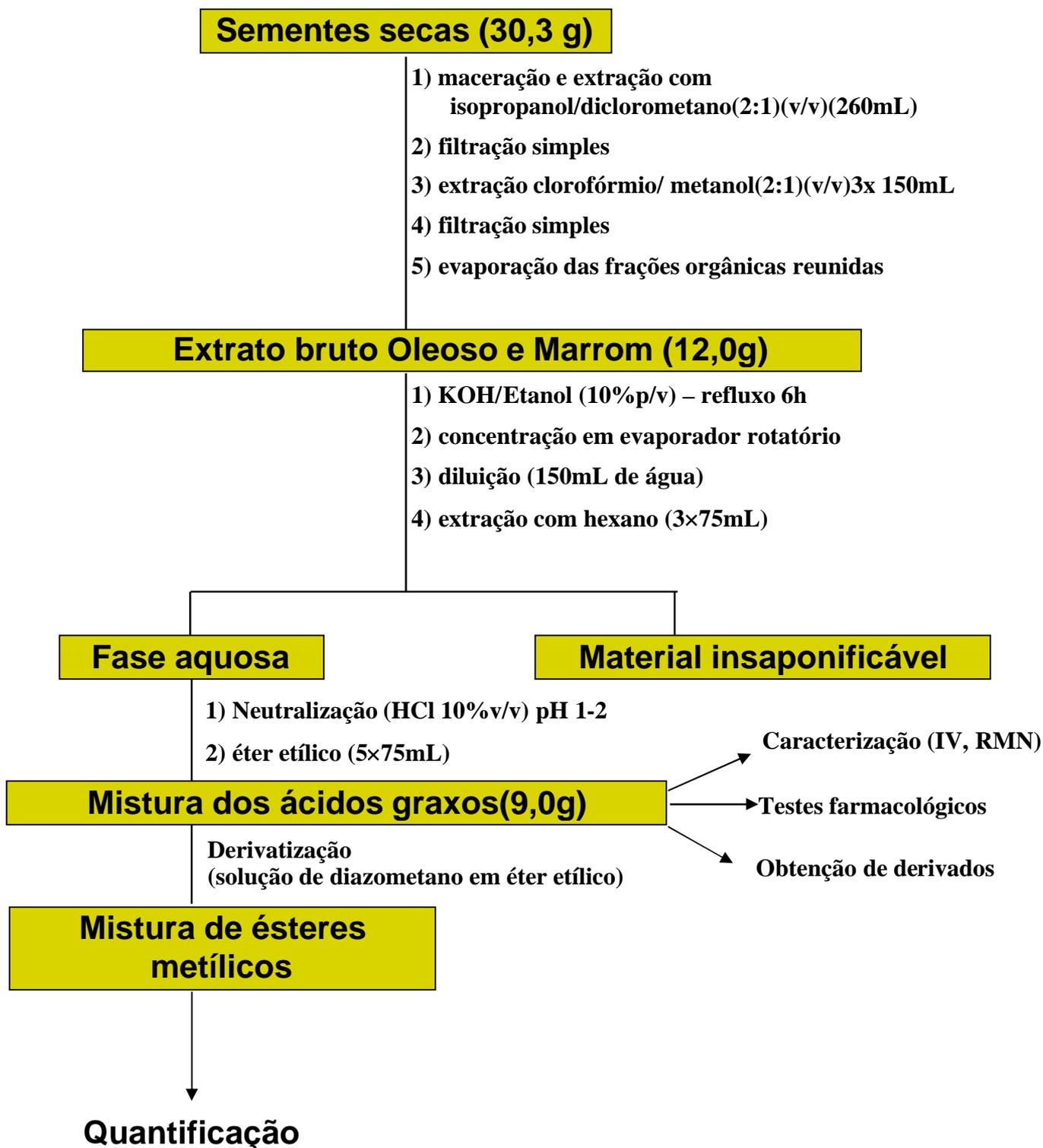
3.2.1. Coleta do Material Botânico

O material vegetal utilizado neste trabalho foi coletado em julho de 2001 na Serra do Caparaó em Minas Gerais, constando de frutos secos de *Carpotroche brasiliensis* (Endl.). Exsiccatas desta espécie foram depositadas no Herbário do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob referência R-203170.

3.2.2. Extração dos ácidos graxos de *C. brasiliensis*

As sementes secas (30,3g) foram maceradas com o uso de um gral. Após a maceração foi realizada uma extração com 260 mL de uma mistura de solventes diclorometano/ isopropanol 2/1(v/v). O extrato marrom escuro resultante foi filtrado em papel de filtro (tipo Whatman qualitativo) e a seguir concentrado em evaporador rotatório. O resíduo macerado foi extraído com mistura de clorofórmio/metanol 2/1, até o esgotamento total das sementes (3 volumes de 150 mL). Este segundo extrato foi concentrado em evaporador rotatório, reunido ao primeiro e em seguida, o solvente foi totalmente eliminado em alto vácuo, obtendo-se ao final, um óleo denso marrom escuro (12,0g).

O óleo marrom foi saponificado sob refluxo por 6 horas com solução etanólica de KOH (100 mL, 10%p/v). Após resfriamento, o solvente foi evaporado e a mistura reacional foi diluída com água (150 mL) e extraída com hexano P.A. (3 volumes de 75 mL), para a remoção da matéria não saponificável. A seguir, a fase aquosa foi acidificada a pH 1-2 com solução aquosa de HCl 10%(v/v) e extraída com éter etílico (5 volumes de 75 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). A partir da filtração e evaporação do solvente obteve-se a fração correspondente a mistura bruta dos ácidos graxos (9,0 g), de acordo com o **esquema 2**.



Esquema 2: Extração da fração ácida de *C. brasiliensis*

3.2.3. Caracterização da mistura de ácidos graxos e dos ésteres metílicos por espectrometria de infravermelho, ressonância magnética de ^1H e ^{13}C e de massas

A mistura bruta de ácidos graxos foi caracterizada por espectrometria de infravermelho, espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C). Os ésteres metílicos derivados desta mistura também foram caracterizados pelas mesmas técnicas, além da técnica de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrômetria de massas, segundo o método CB-2 descrito no item 3.1.3. Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao detector de ionização de chama (procedimento descrito no item 3.1.3.)

3.3. Determinação da posição da ligação dupla do ácido górrico por espectrometria de massas através de adutos de dissulfeto de dimetila

Na determinação da insaturação presente na cadeia lateral ligada ao anel ciclopentênico da estrutura química do ácido górrico, um dos constituintes presentes na fração ácida de *C. brasiliensis*, foi empregado o dimetil dissulfeto (DMDS). Este composto tem sido utilizado para a derivatização de alquenos permitindo a determinação da posição das ligações duplas por espectrometria de massas (BUSER et al, 1983). O espectro de massas gerado por impacto de elétrons dos derivados metiltiolados apresenta fragmentos característicos de fácil identificação, além do pico do íon molecular (M^+).

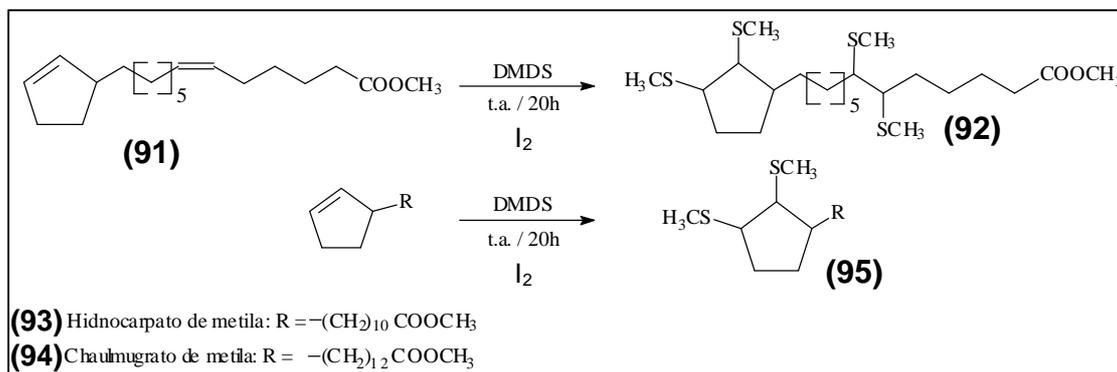


Figura 26: Reação de obtenção dos derivados metiltiolados a partir da mistura de ácidos graxos do óleo da semente do fruto de *C. brasiliensis*

Procedimento:

Uma alíquota da fração ácida (6 mg) foi derivatizada em hexano P.A. (0,4 mL) através da adição de dissulfeto de dimetila (0,35 mL) e uma solução de iodo (0,015g de Iodo em 0,3 mL de éter etílico). A reação foi realizada em um frasco de 5 mL vedado com tampa de teflon. A reação foi mantida sob agitação, durante 20 h, a temperatura ambiente. O produto da reação foi diluído em 0,5 mL de hexano e o iodo foi removido do meio pela adição de 1 mL de uma solução aquosa de $Na_2S_2O_3$ 50% (p/v). A fase orgânica foi separada e concentrada até 0,5 mL (aproximadamente). Uma alíquota de 2 μ L da fase orgânica foi imediatamente analisada por CG-EM. As condições cromatográficas do método utilizado, CB-01, estão presentes no item 3.1.3.

3.4. Quantificação dos ácidos graxos de *C. brasiliensis* por Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)

A mistura de ácidos graxos extraída da semente de *C. brasiliensis* foi inicialmente derivatizada com uma solução diazometano em éter etílico antes da injeção no sistema cromatográfico.

3.4.1. Derivatização das amostras com Diazometano em éter etílico

No preparo de diazometano, foi seguido o procedimento descrito na literatura por Vogel (VOGEL et al, 1996). A aparelhagem utilizada, fabricada pela Aldrich é própria para o preparo de diazometano (Diazomethane Generator nº 210.025-0/ Aldrich Diazald Kit). Primeiramente, foram adicionados 30 mL de etanol (96%) em 8mL de uma solução aquosa contendo 5g de KOH. Esta solução foi transferida para um balão de 200mL equipado com funil de adição e condensador. A solução foi então aquecida em banho de água a 60-65^oC. No funil de adição foi introduzida uma solução de 43g (0,2 mol) de sal de diazald (N-metil-N-nitroso tolueno – p-sulfonamida) em 250 mL de éter etílico. Esta solução foi gotejada no período de 30 minutos. A taxa de gotejamento da solução foi ajustada para a mesma taxa da destilação. O produto foi coletado em um balão de 500 mL. Utilizou-se também um tubo de ensaio com éter etílico ligado à unha. Este tubo funciona como “trap” para coletar todos os vapores que não condensaram e escaparam do balão de coleta. O balão de coleta e o tubo permaneceram em um banho de gelo.

Quando o funil se esvaziou, adicionou-se éter etílico (30 mL) lentamente até que o destilado estivesse incolor.

As amostras contendo ácidos carboxílicos foram dissolvidas em éter etílico. A solução de diazometano foi adicionada às amostras até que não mais fosse observada a evolução de N₂, quando, então, a adição de pequena quantidade era adicionada, com excesso, para certificar a ausência de ácidos em solução.

3.4.2. Preparo das soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração

Quanto aos aspectos práticos, o preparo das soluções padrão pode ser realizado de diversas maneiras. Em uma delas, prepara-se uma solução mais

concentrada, a partir da pesagem do padrão, denominada solução estoque. As soluções preparadas por diluição da solução estoque são chamadas soluções de trabalho.

Primeiramente foi preparada a solução estoque do padrão elaidato de metila. Para isso pesou-se 10,0 mg do padrão em um balão volumétrico de 10 mL, que foi avolumado com diclorometano P.A. Esta solução estoque (1mg/mL) foi utilizada para o preparo das soluções de trabalho para a construção da curva analítica. O elaidato de metila foi utilizado para a construção da curva, pois não havia nenhum éster derivado de ácido ciclopentênico graxo puro para ser utilizado como padrão.

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução estoque de heptadecanoato de metila (utilizado como padrão interno). A solução estoque de miristato de metila (surrogate) foi preparada pesando-se 6,0 mg em balão de 5 mL após derivatização do ácido mirístico com diazometano.

3.4.3. Linearidade do sistema analítico

A linearidade do sistema analítico foi avaliada injetando-se soluções de elaidato de metila nas concentrações de 1, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata, no cromatógrafo à gás acoplado ao detector de ionização de chama.

Em cada ponto da curva de calibração, foi adicionado padrão interno (heptadecanoato de metila), de modo que a concentração final fosse de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Para a construção da curva adotou-se a razão entre as áreas do analito e do padrão interno como variável dependente (eixo y) e a razão entre as concentrações do analito (elaidato de metila) e o padrão interno (heptadecanoato de metila) como variável independente (eixo x).

A análise da linearidade da curva foi realizada utilizando-se o método dos mínimos quadrados. O aplicativo excell foi utilizado na elaboração e avaliação dos resultados.

3.4.4. Preparo das amostras de ésteres metílicos de *C. brasiliensis*

Alíquotas da mistura de ácidos graxos da fração ácida de *C. brasiliensis* foram esterificadas com diazometano e pesadas em balão volumétrico após a evaporação do solvente de modo a ajustar as concentrações das principais substâncias dentro da faixa de linearidade da curva analítica. Para isso, a solução estoque da mistura de ésteres metílicos derivados da mistura de ácidos de *C. brasiliensis* foi preparada pesando-se 10 mg desta mistura de ésteres metílicos em balão volumétrico (10 mL) e avolumando-se com diclorometano P.A. A partir da solução estoque (1 mg/ mL) preparou-se soluções mais diluídas nas concentrações de 300, 350 e 400 µg/mL (amostras 1, 2 e 3, respectivamente). Em cada uma destas amostras foi adicionado padrão interno (heptadecanoato de metila) e meristato de metila a partir das suas soluções estoque (preparadas conforme descrito no item 3.4.6), de modo que a concentração final fosse de 50 µg/mL e 60 µg/mL, respectivamente. Cada uma das soluções foram injetadas três vezes no cromatógrafo à gás acoplado ao detector de ionização de chama. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.1.3.

3.4.5. Estudo da estabilidade química dos ácidos ciclopentênicos em extratos frescos e envelhecidos das misturas de ácidos graxos de *C. brasiliensis*

A fração ácida utilizada nos testes farmacológicos foi mantida sobre refrigeração durante todo o trabalho, no período de 3 anos. A fim de avaliar a estabilidade dos constituintes desta fração, comparou-se a sua composição com três amostras de mistura de ácidos de *C. brasiliensis*, amostras 4, 5 e 6. A amostra 4 é constituída da fração ácida extraída de sementes secas de frutos de *C. brasiliensis* recentemente coletados (Outubro de 2005). A amostra 5 é constituída da mistura de ácidos graxos que foi mantida durante 2 anos sobre a bancada em frasco de vidro fechado a temperatura ambiente. A amostra 6 é

constituída da mistura de ácidos graxos que foi mantida durante 3 anos sobre a bancada, em um frasco de vidro aberto, sob a ação da luz e temperatura ambiente.

Na determinação da composição dos ácidos ciclopentênicos majoritários presente nestas soluções, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.4.4. As soluções foram preparadas pesando-se 5 mg da fração ácida esterificada com diazometano em um balão volumétrico de 5 mL. A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções das amostras 4, 5 e 6 na concentrações de 250 µg/mL. Em seguida as amostras foram injetadas no CG-DIC segundo o método descrito no item 3.1.3.

As amostras 5 e 6 compostas pela mistura de ácidos que ficou sobre a bancada foram caracterizadas por espectrometria de massas, IV, RMN ^1H e ^{13}C .

3.5. Construção de uma coleção (biblioteca) de moléculas a partir da mistura de ácidos graxos extraídos do óleo da semente de *C. brasiliensis*

Na busca de estruturas bioativas, foi realizada a síntese de derivados oxidados a partir da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*, dando origem a uma coleção de moléculas estruturalmente relacionadas.

3.5.1. Epoxidação dos ésteres metílicos derivados da fração ácida de *C. brasiliensis*

A mistura de ésteres metílicos utilizada como reagente na reação de epoxidação foi obtida a partir da esterificação da fração ácida de *C. brasiliensis*. A reação de esterificação foi realizada de acordo com o procedimento experimental descrito na literatura (SOARES, 1988).

3.5.1.1. Esterificação dos ácidos graxos de *C. brasiliensis*

Uma alíquota da mistura bruta dos ácidos graxos (1,0 g; 3,8 mmol, $MM_{\text{médio}} = 264,5$) foi refluxada durante 4 horas em metanol (50 mL), na presença de ácido sulfúrico concentrado (0,5 mL) como catalisador. Após resfriamento, a mistura reacional foi concentrada e posteriormente diluída com hexano P.A. (3 x 50 mL), extraída com água (3x 50 mL), solução aquosa saturada NaHCO_3 (2x 50 mL), solução aquosa saturada de NaCl (50mL) e tratada com MgSO_4 anidro. Filtração simples e evaporação do solvente, forneceu a mistura dos ésteres metílicos como óleo marrom. A cromatografia em coluna desta mistura, utilizando gel de sílica como fase estacionária e um gradiente de polaridade crescente de *n*-hexano e acetato de etila como eluente, forneceu a mistura de ésteres metílicos (0.8 mg; 80%), como um óleo amarelado. A eluição dos ésteres da coluna foi acompanhada por cromatografia em camada fina, o que permitiu a reunião das frações ($R_f=0,76$ - hexano/acetato de etila (70:30 v/v)).

3.5.1.2. Epoxidação da mistura de ésteres metílicos:

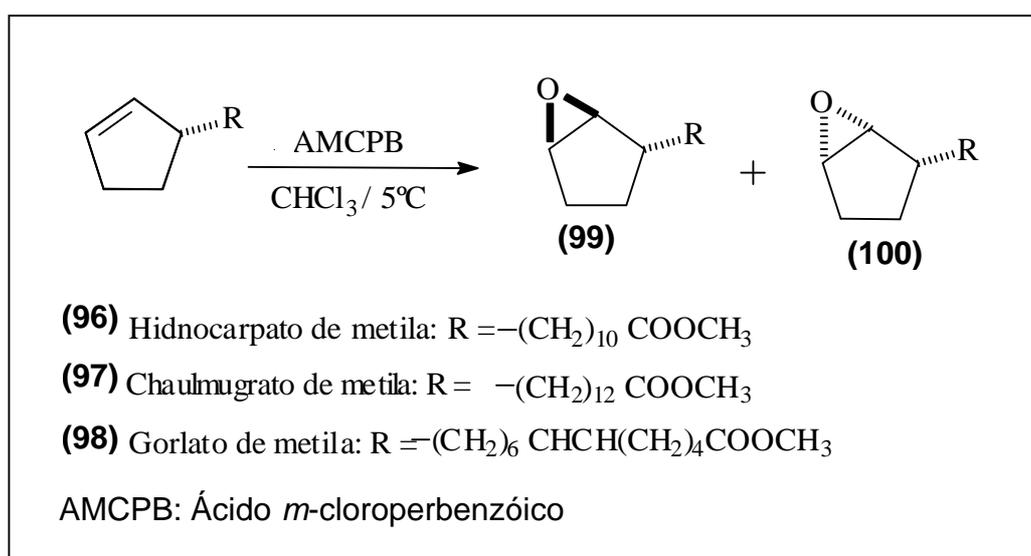


Figura 27: Epoxidação da mistura de ésteres metílicos ciclopentênicos derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis*

A reação de epoxidação foi realizada conforme o procedimento descrito na literatura (LOPES, 1982 ; SRINIVASAN, 2002).

À uma solução da mistura resfriada (5 °C) de ésteres metílicos (780 mg; 2,80 mmol, $PM_{\text{médio}} = 276,5$) derivados da fração ácida de *C. brasiliensis* em clorofórmio (40 mL), adicionou-se ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB) (700 mg; 4,12 mmol) lentamente e a solução resultante foi agitada durante 2 horas. Após a dissolução da mistura reacional em clorofórmio (25 mL), extração com solução aquosa de NaOH 5% (p/v) (3X 50 mL), secagem com MgSO₄ anidro, filtração e evaporação do solvente, foi obtido um óleo levemente amarelado. A cromatografia em coluna, utilizando gel de sílica como fase estacionária e um gradiente de polaridade crescente de hexano e acetato de etila como eluente, forneceu a mistura de epóxidos (650 mg, 79%) como um óleo incolor (hexano/acetato 7/3). Rf=0,75.

Os produtos da reação de epoxidação foram caracterizados por espectrometria no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e Carbono e espectrometria de massas.

3.5.2. Obtenção de álcoois a partir da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*

O procedimento utilizado na síntese de álcoois a partir de olefinas via hidroboração está bem descrito na literatura (GARG & BROWN, 1986). Primeiramente, o organoborano é formado a partir da reação da olefina com borano (BH₃) e em seguida sofre oxidação com a adição de peróxido no meio reacional.

3.5.2.1. Preparo da solução de diborana 1,0 M (BH₃ em THF)



À solução de NaBH₄ (7,12g, 0.19 mmols) em 250 mL de THF seco foi adicionado 31,7 mL de BF₃ em éter etílico. O meio reacional foi mantido sob

agitação a temperatura ambiente e sob atmosfera de argônio. Após 4 horas, a agitação foi interrompida e a solução foi armazenada sob refrigeração.

3.5.2.2. Secagem do Tetraidrofurano (THF)

O solvente THF foi tratado com sódio metálico em uma aparelhagem própria para destilação. Primeiramente, o solvente foi mantido sob refluxo durante 7 horas, adicionou-se, em seguida, benzofenona. Quando ocorre a coloração azul da benzofenona, o solvente é destilado e coletado com uma seringa, previamente seca, e transferido diretamente para o balão da reação que se encontrava seco sob atmosfera de argônio.

3.5.2.3. Obtenção da mistura de álcoois a partir da fração ácida de *C. brasiliensis*

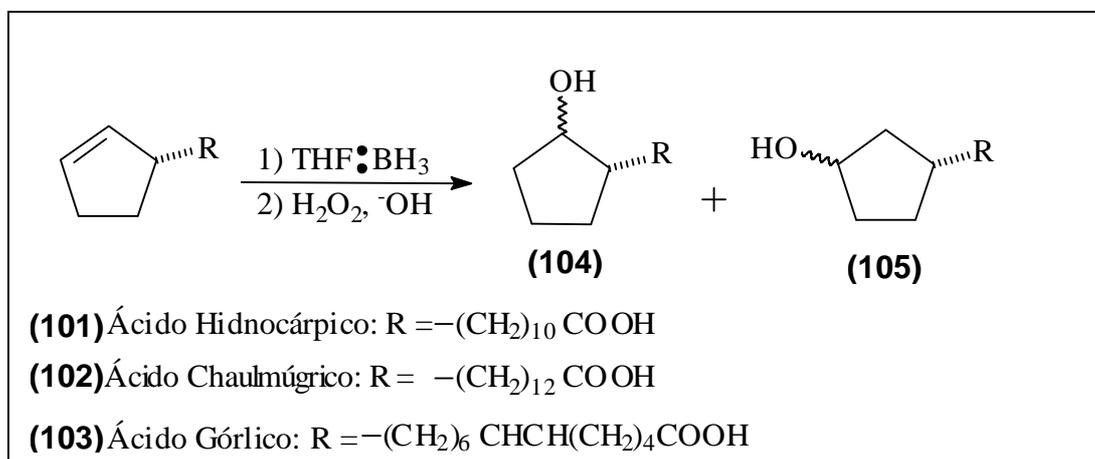


Figura 28: Hidroboração da mistura de ácidos ciclopentênicos de *C. brasiliensis*

À solução da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* (400 mg, 1,52 mmols) em THF seco (7,0 mL) foi adicionada lentamente, durante 5 minutos, 10 mL da solução de diborano 1,0 M. O meio reacional foi mantido sob

agitação em banho de gelo. Após 1 hora, adicionou-se 10 mL de uma solução de NaOH (3N) e 3 mL de uma solução H₂O₂ 30% (v/v). Após a adição do agente oxidante, a solução foi mantida sob aquecimento a 60 °C durante 1 hora.

Após este período, a mistura reacional foi concentrada e diluída com água (50 mL). A seguir, a fase aquosa foi acidificada a pH 1-2 com solução aquosa de HCl 10%(v/v) e extraída com éter etílico (4 volumes de 75 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). A partir da filtração e evaporação do solvente obteve-se a fração correspondente a mistura bruta dos derivados oxidados (402 mg) como um óleo amarelado. O produto foi metilado com diazometano e injetado no CG-EM. A conversão foi de 100%.

Os produtos da reação de hidroboração foram caracterizados por espectrometria no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio e Carbono e espectrometria de massas.

3.6. Atividade farmacológica da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*

3.6.1. Atividade antiinflamatória

3.6.1.1. Atividade antiinflamatória da mistura de ácidos graxos da semente dos frutos de *C. brasiliensis* através do teste do edema de pata de rato induzido por carragenina

A atividade antiinflamatória do óleo de *C. brasiliensis* foi determinada, *in vivo*, utilizando-se o teste do edema de pata de rato induzido por carragenina (RIBEIRO et al, 1998; LIMA et al, 2005).

METODOLOGIA

O edema é induzido no animal pela administração subplantar de carragenina 1% em solução salina. Na pata traseira direita do animal administra-se a carragenina e na pata contralateral, administra-se solução salina estéril (0,9% NaCl). Após a administração subplantar, a cada hora, durante quatro horas, avalia-se o volume de cada pata.

O aparelho utilizado é um pletismômetro acoplado a uma bomba peristáltica. O pletismômetro é composto por duas cubas de vidro, o que possibilita a realização de pelo menos dois experimentos concomitantes. Cada cuba é preenchida com uma solução aquosa de tensoativo (2%). O fluxo do aparelho é calibrado com o uso de uma proveta: conta-se o tempo que leva para a proveta ser preenchida até um determinado volume e então, avalia-se o volume de solução deslocada a cada segundo. Cada leitura é feita três vezes e, a média é o valor tomado como padrão. Durante o experimento, cada uma das patas do animal é colocada na cuba, deslocando um volume de solução. Calcula-se os volumes das patas (μL) através da medida do tempo necessário para repor o volume deslocado, multiplicado pelo fator de calibração do fluxo de preenchimento da cuba ($\mu\text{L/s}$). Considera-se a média de três leituras consecutivas. O edema é calculado subtraindo-se da média do volume deslocado pela pata direita (pata com carragenina), da média do volume

deslocado pela pata esquerda (pata com salina) do animal. A atividade antiinflamatória foi avaliada em % de inibição do edema comparado com o grupo controle.

A fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis* foi administrada oralmente em ratos Wistar (120-200g) nas doses de 10, 50, 100, 200 e 500 mg/kg (0,1 mL/20g) como uma suspensão em etanol/Tween 80/água (2:2:20 v/v/v), uma hora antes da injeção subplantar de carragenina.

Ao término dos experimentos de edema de pata de rato, os efeitos ulcerogênicos foram também investigados (CHAN, 1995). Os animais foram sacrificados e seus estômagos foram abertos ao longo da maior curvatura, para a visualização das lesões gástricas, para tanto, utilizou-se um estereomicroscópio.



Figura 29: Imagem do edema de pata de rato

(A) Pata após a injeção de carragenina 1% em solução salina



(B) Pata após a injeção da solução de salina estéril (0,9% NaCl)

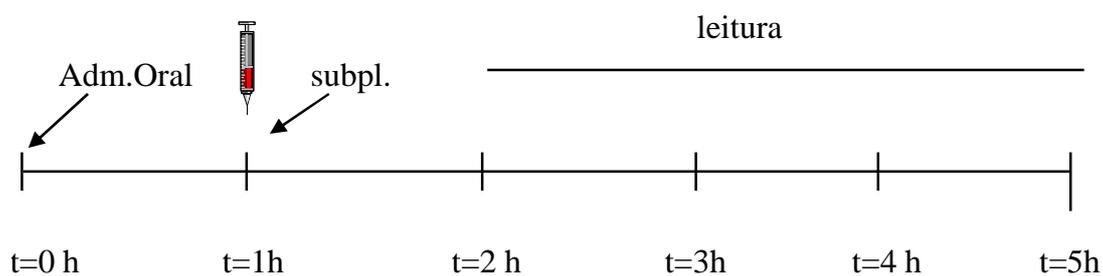


Figura 30: Procedimento do teste de inflamação induzida por carragenina

3.6.1.2. Atividade Antiinflamatória dos derivados oxidados da mistura de ácidos graxos do óleo de *C. brasiliensis*

A atividade antiinflamatória dos derivados da fração ácida do óleo de *C. brasiliensis* também foi determinada, *in vivo*, utilizando-se o teste do edema de pata de rato induzido por carragenina (RIBEIRO et al, 1998), conforme descrito no item 3.6.1.

A mistura dos derivados epóxidos e álcoois foram administrado oralmente em ratos Wistar (120-200g) na dose de 200 mg/kg (0,1 mL/20g) como uma suspensão em tween/etanol/água (1:1:10 v/v/v).

O edema foi avaliado pela determinação dos volumes obtidos na 3ª hora após a injeção subplantar de carragenina (1%).

3.6.2. Atividade analgésica

3.6.2.1. Contorção abdominal induzida por ácido acético.

A atividade antinociceptiva foi determinada *in vivo* em camundongos utilizando o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0.6 % (0,1mL/10g, intraperitoneal) (RIBEIRO et al, 1998; LIMA *et al*, 2005). A fração ácida foi administrada oralmente (100- 200mg/kg; 0.1 mL /20g) como uma suspensão em etanol/ Tween 80/ água (2:2:20, v/v/v) uma hora antes da injeção intraperitoneal de ácido acético. O ácido acético induz dor no animal. Dez minutos após a injeção intraperitoneal, o número de contorções do animal foi registrado durante 20 minutos. O grupo de controle recebeu um volume equivalente do veículo (etanol/ Tween 80/ água na proporção de 2:2:20, v/v/v) e o grupo de controle positivo recebeu indometacina 10 mg/kg. A atividade antinociceptiva foi apresentada como percentagem de inibição de contrações comparada com o grupo controle do veículo. Cada grupo de animais continha no mínimo 8 camundongos albinos suíços pesando de 18 a 25 g.

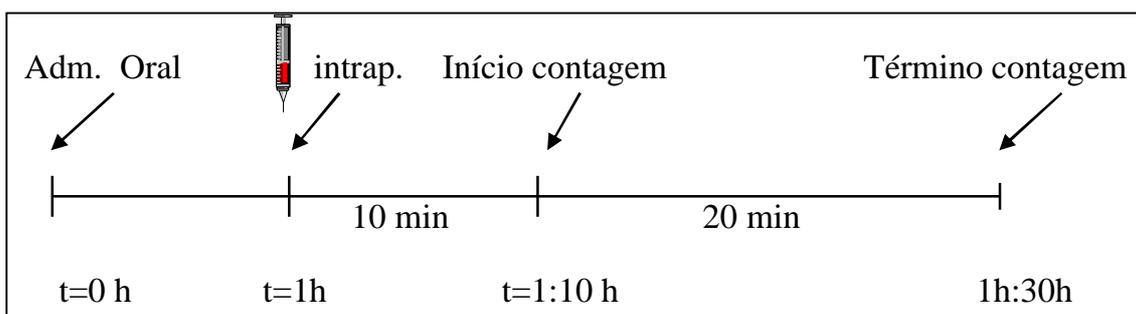


Figura 31: Procedimento do teste da contorção abdominal induzida por ácido acético

3.6.2.2. Teste da placa quente (“hot- plate”)

Grande parte dos mecanismos associados ao fenômeno de dor e hiperalgesia foi estabelecida com base em estudos de resposta nociceptiva em modelos *in vivo* (HUNSKAAR, BERGE & HOLE, 1986).

O teste da placa quente descrito por Woolfe e MacDonald é um dos testes mais usados para avaliar a nocicepção e analgesia em roedores (WOOLFE & MACDONALD, 1944). Originalmente o teste media a resposta nociceptiva de ratos quando colocados sobre uma placa cuja temperatura variava de 55 a 70 °C. Mais tarde, o teste foi modificado por Eddy e colaboradores, que usaram uma temperatura constante de cerca de 55 °C (EDDY et al, 1950). A latência para várias respostas comportamentais, incluindo salto, chute e agitação da pata ou a lambida das patas traseiras e dianteiras, é usada como medida da dor (algesia) em ratos e camundongos.

Em geral, são realizadas duas medidas controle em intervalo de 30 minutos. Através dessas medidas se estabeleceu o tempo de “cut-off” (tempo máximo de permanência do animal sob a placa), calculado como sendo de aproximadamente 3 vezes o valor médio da 2ª medida controle. A primeira leitura controle tem o objetivo de adaptação dos animais ao ensaio. A segunda leitura controle é utilizada para a exclusão do ensaio os animais que possuem período de latência superior a 10 s, sendo considerada como a resposta controle do tempo zero.

Foi utilizado um aparelho de placa-quente (modelo DS-37, Ugo Basile, Varese, Itália), mantido à temperatura de 56 ± 1 °C. Foram utilizados camundongos albinos suíços machos, pesando de 18 a 25g.

Os animais foram divididos em grupos: veículo, morfina 300 mg/kg (controle positivo) e mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* na dose de 100 mg/kg, administrados por via oral em seguida à segunda leitura controle (Figura 33).

As medidas do tempo de resposta são registradas em intervalos de 30 minutos após a administração durante 2 horas (tempos: 30, 60, 90 e 120 minutos) (Figura 33).

O tempo entre a colocação do animal sobre a placa e o primeiro sinal de lambida ou retirada da pata foi registrado como latência. As latências foram de 6 a 10 s. Foi estabelecido um cut-off (tempo máximo sobre a placa) de 30 s para prevenir qualquer lesão na pata do animal.



Figura 32: Teste da placa quente (“hot plate”)

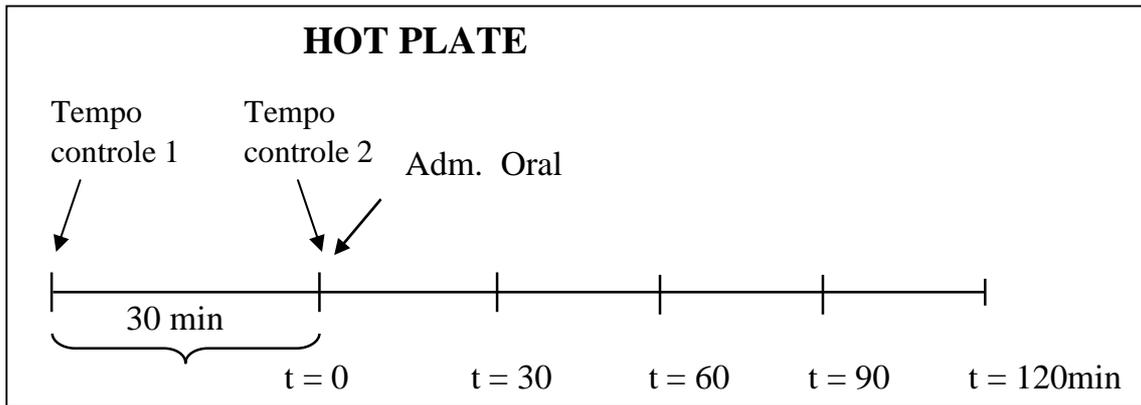


Figura 33: Procedimento do teste de “hot-plate”

3.6.2.3. Teste da Formalina

O teste da formalina foi realizado para avaliar o efeito nociceptivo associado à uma inflamação, isto é, uma hiperalgesia. Neste teste, o animal, geralmente rato ou camundongo, é submetido a uma dor moderada e contínua provocada pela injúria do tecido após a injeção de formalina.

A formalina é uma solução aquosa contendo 37 % (p/p) de formaldeído. A injeção subcutânea de uma solução diluída de formalina é usada para estimular a dor. Devido a este estímulo, o animal passa a ter um comportamento facilmente identificado como lambar, morder e retrain a pata tratada com formalina.

Uma importante característica do teste da formalina, em roedores, é a presença de duas fases de comportamento nociceptivo, as quais estão envolvidas com diferentes estímulos. A primeira fase se inicia imediatamente após a injeção de formalina com duração de 3 a 5 minutos. Nesta fase a dor é observada pelo estímulo dos receptores da dor (nociceptores) e principalmente das fibras nervosas primárias aferentes do tipo C.

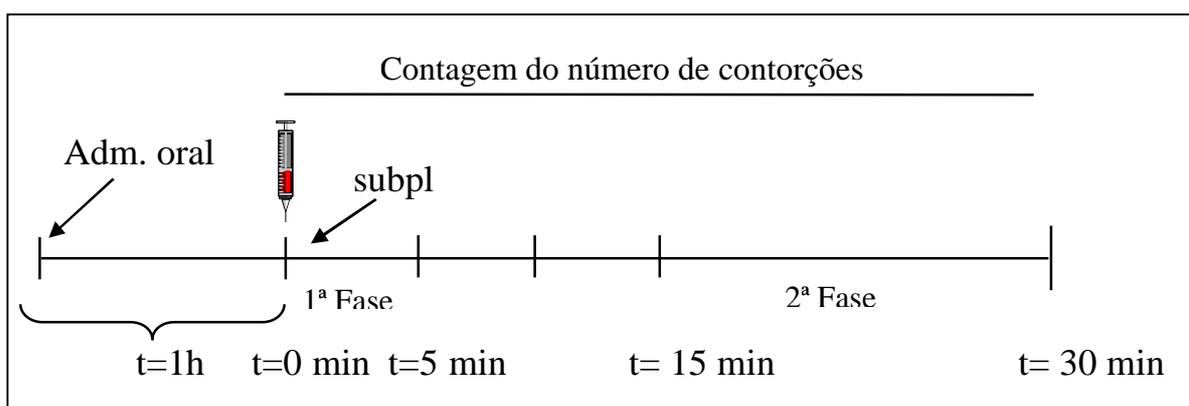


Figura 34: Procedimento do teste da formalina

A segunda fase se inicia de 15 a 20 minutos após a injeção de formalina. Resultados experimentais presentes na literatura indicam que a histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina estão envolvidas nesta fase.

O teste da dor induzida por formalina foi realizado de acordo como foi descrito por Hunskaar e Hole (HUNSKAAR E HOLE, 1987, LIMA et al, 2005). Os animais foram divididos em grupos: veículo (etanol/Tween 80/água na

proporção de 2:2:20 v/v/v), indometacina 10 mg/kg (controle positivo) e fração ácida de *C.brasiliensis* 200 mg/kg; administrados por via oral. Cada grupo continha no mínimo 8 animais pesando de 18 a 25 g. Após 1 hora da administração, os camundongos receberam uma injeção na área subplantar de uma das patas traseiras com uma solução de formalina 2,5% (20 µL). O tempo que o animal passou lambendo ou mordendo a pata traseira após a injeção de formalina foi registrado. Dois períodos distintos de intensa lambida foram identificados e marcados separadamente. O primeiro período foi marcado durante 0-5 minutos (fase neurogênica) e o segundo período marcado de 15 a 30 minutos (fase inflamatória).

3.6.3. Teste de Coordenação Motora

Neste estudo, utilizou-se o teste de Rota-rod, que mede o grau de disfunção motora do animal (POURGHOLAMI et al, 1999, LIMA et al, 2005). Este teste permitiu avaliar o efeito sedativo e o relaxamento muscular da fração de ácidos extraídos das sementes de *C. brasiliensis* quando administrada em camundongos na dosagem de 200 mg/kg (v.o).

Neste teste foi utilizado o aparelho de Rota-rod (AVS, Brasil) constituído de uma barra horizontal de 2,5 cm de diâmetro dividido em cinco sessões iguais por seis discos com 25 cm de diâmetro. Isso permite que cinco camundongos sejam avaliados ao mesmo tempo. Os camundongos foram treinados durante 3 dias para manter-se em equilíbrio no eixo (roda), a uma velocidade de 10 rpm, durante 2 minutos. Os camundongos que, ao final dos 3 dias, conseguiram permanecer no eixo durante o tempo estabelecido, foram selecionados (n=9) e divididos em dois grupos: o grupo controle e o grupo tratado com a droga. No dia do teste, os camundongos foram colocados no rota rod durante 2 minutos antes da administração da fração ácida. Uma hora após a administração, os camundongos foram colocados no equipamento e o seu tempo de permanência foi registrado.



Figura 35: Equipamento utilizado no teste de “rota-rod”

3.6.4. Teste de toxicidade

Para a avaliação da toxicidade aguda da fração ácida de *C. brasiliensis*, testou-se a mistura de ácidos nas doses de 100 a 500 mg/kg, além do grupo controle. Para cada grupo (n= 5) foram utilizados camundongos suíços, machos, pesando entre 25-30 g. Os animais foram observados por um período de 14 dias. A mortalidade e diferentes efeitos fisiológicos e comportamentais (salivação, tremores, locomoção, defecação) foram avaliados.

4. Resultados e discussão

4.1. Identificação dos constituintes presentes na mistura de ácidos graxos da semente do óleo de *C. brasiliensis*

4.1.1. Caracterização dos constituintes da mistura de ácidos graxos por espectrometria de infravermelho e ressonância magnética de ^1H e ^{13}C

A saponificação do extrato bruto oleoso da semente resultou na fração constituída pela mistura de ácidos graxos (esquema 2). O espectro de infravermelho desta mistura (em anexo, pág.112) apresentou como sinais principais, uma banda intensa e larga de vibração axial da ligação O-H entre 2600 até 3100 cm^{-1} e outra banda de deformação angular desta ligação fora do plano em 914 cm^{-1} , além do sinal intenso de deformação axial de C=O de ácidos carboxílicos em 1713 cm^{-1} . Este deslocamento da banda da carbonila se deve à formação de dímeros de ácidos carboxílicos em soluções concentradas devido às ligações de hidrogênio. As bandas de deformação axial de C-H da porção alquila mais fracas (2929 e 2851 cm^{-1}) se superpõem à banda larga de O-H. Destacam-se também as bandas de deformação axial de =C-H em 3050 cm^{-1} e as bandas referentes à vibração de deformação axial da ligação C=C em 1614 cm^{-1} .

O sinal em 718 cm^{-1} é atribuído à deformação angular assimétrica no plano dos grupos metilenos, bastante característico de compostos que possuem uma cadeia linear de sete ou mais átomos de carbono, como os ácidos graxos em estudo. A banda em 1287 cm^{-1} é associada, geralmente, à deformação axial de C-O, e aparece usualmente no espectro de ácidos graxos de cadeia longa como um dublete, conforme pode se observado no espectro em anexo (pág.112).

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desta mistura estão presentes na tabela 4. Os espectros estão em anexo (páginas 113 e 114, respectivamente).

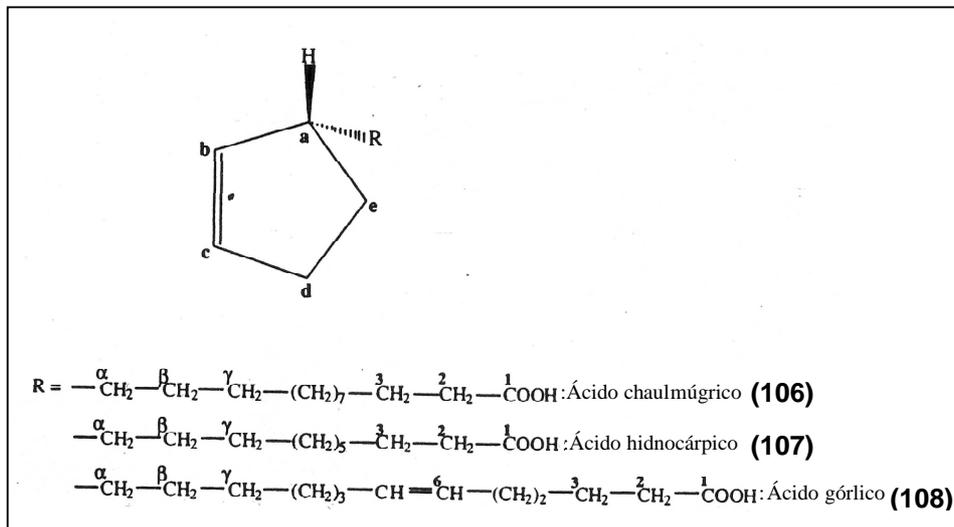


Figura 36: Estrutura química dos ácidos ciclopentênicos presentes no óleo das sementes de *C. brasiliensis*

Tabela 4: RMN ^1H (300 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 da mistura de ácidos graxos ciclopentênicos presente no óleo das sementes de *C. brasiliensis*.

Posição do Carbono	δ_{C}	δ_{H}
1	180,38	
2	34,25	2.32-2.37
3	24,85	1.61-1.66
4,5,6 ^a ,7 ^a ,8,9,10	29,24-29,81	2,35
6 (ac. górlico)	129,15	5,35
7 (ác.górlico)	130,72	5,35
γ	28,126	
β	29,24	
α	36,35	
a	45,78	2,6
b	135,64	5,70
c	130,14	5,68
d	32,15	2,34
e	29,96	2.01-2,04

a: referente aos ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico. Sinais de Hidrogênio sem indicação de multiplicidade correspondem à existência de superposição. As posições dos átomos estão indicadas na figura 35

4.1.2. Caracterização dos constituintes presentes na mistura de ésteres metílicos derivados da fração ácida por espectrometria de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C

O espectro de infravermelho da mistura dos ésteres metílicos derivados da fração ácida (em anexo, pág.115) apresentou como sinais principais, uma banda intensa de deformação axial de C=O de ésteres em 1743 cm⁻¹, bandas de deformação axial de C-H da porção alquila em 2924 e 2853 cm⁻¹ e outra banda de deformação axial de =C-H em 3050 cm⁻¹. A vibração de deformação axial da ligação C=C produziu uma banda de absorção fraca em 1613 cm⁻¹ e as bandas de vibrações de deformação axial de C-O de ésteres estão presentes em 1171 e 1197 cm⁻¹.

Os dados dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C estão na tabela 5 e em anexo (páginas 116 e 117). Os resultados obtidos foram comparados com os dados da literatura (ver tabela 6) dos constituintes puros isolados de uma chaulmugra asiática (BLAISE et al, 1997).

Tabela 5: RMN ¹H (300 MHz) e RMN ¹³C (75 MHz) em CDCl₃ da mistura de ésteres metílicos.

Posição do Carbono	δ _c	δ _H
1	174,50	-
2	34,16	2.32-2.37
3	25,12	1.61
4,5,6 ^a ,7 ^a ,8	29,32-29,94	
6(ac. górlico)	129,25	5,36
7 (ác.górlico)	130,44	5,36
9		
10		
γ	28,15	
β	29,32	
α	36,33	1,26/1,36
a	45,77	2,6
b	135,61	5,68
c	130,25	5,68
d	32,13	2,3
e	30,03	2,02/1,27

a: referente ao ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico . Sinais de Hidrogênio sem indicação de multiplicidade correspondem à existência de superposição de sinais

Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da mistura de ésteres metílicos dos ácidos ciclopentênicos de *Hydnocarpus* sp. (Flacourtiaceae) (BLAISE et al, 1997).

Posição do Carbono	Literatura [1]			
	Ácido Chaulmúgrico δ_c	Ácido Hidnocárpico δ_c	Ácido górglico δ_c	δ_H
1	174.4	174.4	174.35	-
2	34.1	34.1	33.99	2.3
3	24.93	24.93	24.55	1.61
4	29,12	29,12	29,58	
5	29,43	29,43	26,78	
6	29,56	29,56	129,01	
7	29,62	29,62	130,44	
8	29,62	29,62	27,2	
9	29,84	-	29,18	
10	29,76	-	29,69	
γ	27,97	27,97	27,94	
β	29,23	29,23	29,23	
α	36,15	36,15	36,13	1,25/1,35
a	45,58	45,58	45,56	2,6
b	135,45	135,45	135,43	5,68
c	129,97	129,94	129,98	5,68
d	31,96	31,94	31,96	2,3
e	29,87	29,85	29,84	2,02/1,27

[1]BLAISE et al, 1997, Posição do carbono está representada na figura 32.

Os carbonos em δ 130 e δ 135 no espectro de RMN ^{13}C indicam a presença da insaturação no anel, característico de estruturas ciclopentênicas (BLAISE et al, 1997).

A análise dos espectros de RMN da mistura de ésteres metílicos da semente de *C. brasiliensis*, acompanhada da comparação destes valores com os dados dos compostos ciclopentênicos puros isolados de uma chaulmugra, publicados na literatura, indicou tratar-se das estruturas ciclopentênicas comum no óleo das sementes das espécies de flacurtiáceas.

4.1.3. Identificação dos constituintes da mistura de ésteres metílicos do óleo da semente de *C. brasiliensis* por CGAR-EM

A cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) é uma das mais importantes ferramentas para o trabalho fitoquímico que se dedica ao estudo de substâncias de baixa e média polaridade, volatilidade e peso molecular. Esta técnica permite tanto a avaliação da pureza de substâncias isoladas, como a análise de substâncias em misturas complexas.

O princípio de CGAR está baseado na distribuição dos componentes da amostra entre uma fase estacionária depositada sobre as superfícies internas de uma coluna capilar aberta, e uma fase móvel, composta por um gás capaz de transportar as moléculas a serem separadas através da coluna e, portanto também denominado gás de arraste ou gás carreador (SKOOG et al, 1998). A seletividade da coluna capilar de acordo com a fase estacionária é uma característica importante para assegurar o sucesso da análise.

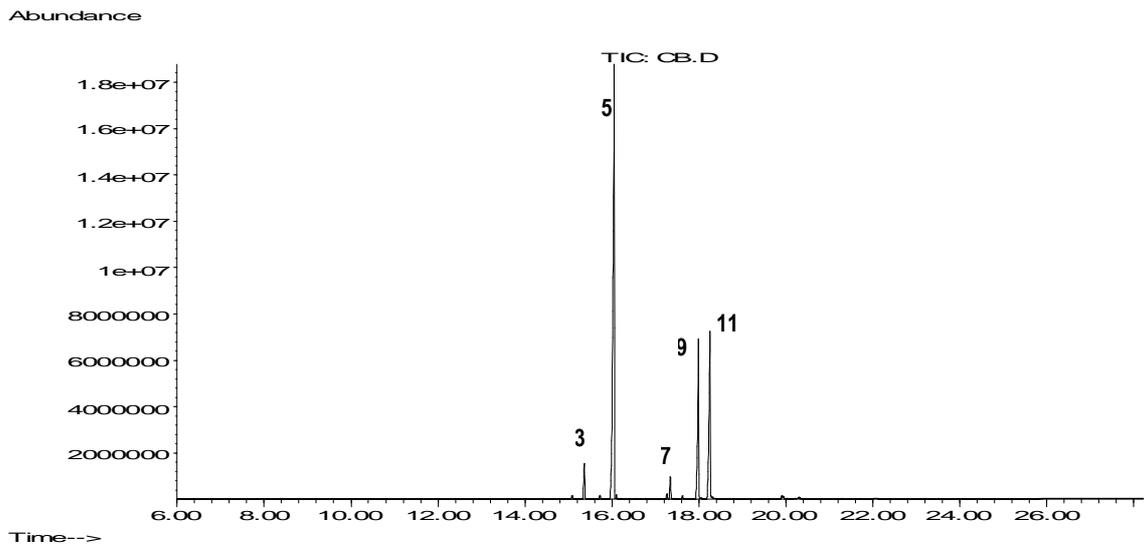
O processo cromatográfico foi iniciado com a introdução de uma solução da mistura de ésteres metílicos de *C. brasiliensis* na coluna através do injetor, pelo qual o gás de arraste fluiu, carregando a amostra. O tempo de eluição de cada componente desta amostra é diretamente proporcional à afinidade deste pela fase estacionária e está indicado na tabela 7. Outro fator determinante no tempo de eluição é o ponto de ebulição de cada componente. No caso de dois componentes de uma mistura apresentar a mesma afinidade pela fase estacionária, aquele que possui maior ponto de ebulição precisará de um tempo de eluição maior. Na técnica de CGAR-EM, a saída da coluna é conectada a um espectrômetro de massas. Esta técnica permite a obtenção de várias varreduras de massas em pontos diferentes de um pico cromatográfico.

Na técnica de impacto de elétrons, a mais comumente utilizada na EM, as moléculas na fase de vapor são bombardeadas por feixe de elétrons de alta energia e o resultado é registrado sob a forma de um espectro de íons separados com base na razão massa/carga (m/z).

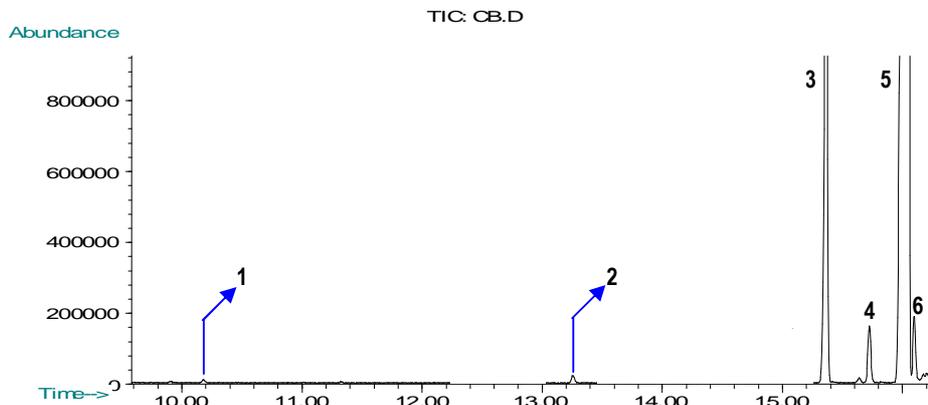
Neste trabalho, a amostra foi derivatizada antes de ser injetada no cromatógrafo, pois os ácidos carboxílicos produzem cauda muito pronunciada quando introduzida nas fases mais comuns (metil e fenil siloxano, por

exemplo). Neste caso, procedeu-se a sua esterificação utilizando um reagente simples, que não deixa resíduo e que dispensa extração posterior, como é o caso do diazometano.

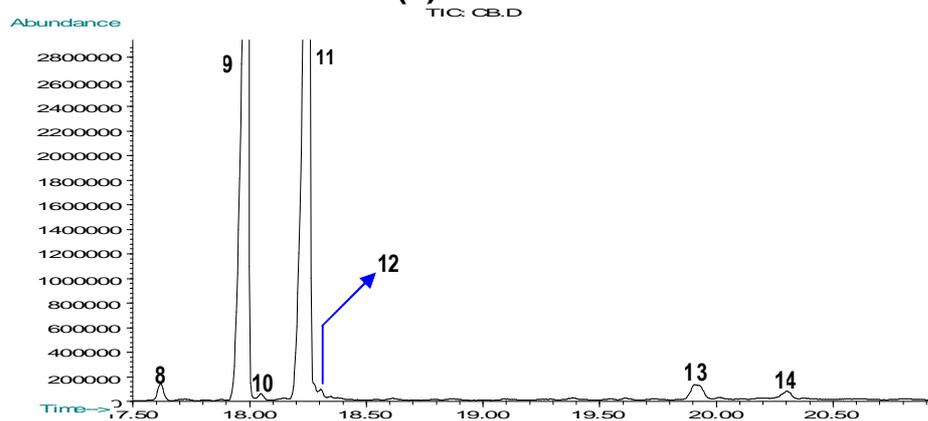
O cromatograma correspondente a mistura de ésteres metílicos derivados da esterificação da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com diazometano, obtido através das condições cromatográficas especificadas no item 3.1.3, está apresentado na figura 37. Na tabela 7 estão presentes os componentes identificados neste cromatograma juntamente com os seus principais íons.



(a)



(b)



(c)

Figura 37: (a) Cromatograma de íons totais da mistura de ésteres metílicos da fração ácida do óleo das sementes de *C. brasiliensis* obtida pela esterificação com solução de diazometano (método CB-02 descrito no item 3.1.3). (b)(c) ampliação do cromatograma (a).

Tabela 7: Lista de compostos identificados por CG-EM na fração ácida do óleo das sementes de *C. brasiliensis* após derivatização com solução de diazometano

	t_r (min)	Ésteres metílicos	Fórmula Molecular	m/z (abundância)	% (CG)
1	10,18	ácido aleprílico	C ₁₃ O ₂ H ₂₂	67 (100), 82 (22), 179 (4)210(5).	0,04
2	13,26	ácido aléprico	C ₁₅ O ₂ H ₂₆	67 (100), 82 (15), 207 (9)238(5).	0,09
3	15,36	Ácido palmítico	C ₁₇ O ₂ H ₃₄	74(100), 87(77), 239(17)270(27)	4,09
4	15,72	Ácido monoaico	C ₁₇ O ₂ H ₂₈	67(100), 80 (27), 233(2), 264(1)	0,40
5	16,04	Ácido hidnocárpico	C ₁₇ O ₂ H ₃₀	67 (100), 82 (25), 235 (7)266(5).	53,4
6	16,09	Composto A	C ₁₇ O ₂ H ₂₈	67(7), 80 (100), 93 (30), 233(7), 264(10)	0,39
7	17,33	Ácido oléico	C ₁₉ O ₂ H ₃₆	55(100)74(73)83(60)264(70)296(11)	2,29
8	17,61	Ácido esteárico	C ₁₉ O ₂ H ₃₈	74(100), 87(67), 255(32)267(11), 298(29)	0,36
9	17,99	Ácido górlico	C ₁₉ O ₂ H ₃₂	67 (100), 80 (48), 261(2)292(5).	17,86
10	18.04	Composto B	C ₁₉ O ₂ H ₃₀	67(6), 80 (100), 93 (32), 259(6), 290(10)	0,19
11	18,25	Ácido chaulmúgrico	C ₁₉ O ₂ H ₃₄	67 (100), 82 (48), 263 (6) 294(4).	19,67
12	18.31	Composto C	C ₁₉ O ₂ H ₃₂	67(6), 80 (100), 93 (32), 261(8), 292(11)	0,19
13	19,92	Ácido oncóbico	C ₂₁ O ₂ H ₃₆	67(100), 80(34), 290 (1), 320 (5)	0,62
14	20,10	Ácido hormélico	C ₂₁ O ₂ H ₃₈	67(100), 82(35), 291(5), 322(3)	0,45

Na tabela 7, pode-se observar uma família de compostos que possui o íon m/z 67 como pico-base. Este íon corresponde ao cátion ciclopentenila presente nos ésteres metílicos dos ácidos ciclopentênicos graxos. É comum se observar a presença do íon $R-C\equiv O^+$ devido a perda do fragmento metoxila - $^{\cdot}OCH_3$ $[M-31]^+$ em ésteres metílicos (Figura 38). Embora o íon de m/z 74, resultante do rearranjo de McLafferty, seja o pico-base de ésteres metílicos graxos, como pode ser observado com os derivados metilados dos ácidos esteárico e palmítico (ver tabela), ele não é intenso para os ésteres graxos ciclopentênicos em estudo, onde prevalece o íon de m/z 67, após a perda da cadeia lateral. No espectro de massas de cada um dos compostos da mistura foi possível observar a presença do íon molecular.

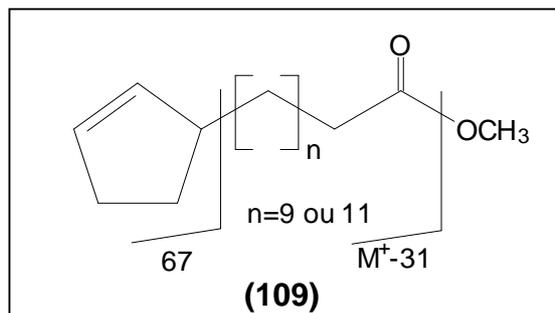


Figura 38: Proposta das principais fragmentações dos ésteres ciclopentênicos

As sugestões indicadas pelas espectrotescas de massas unidas ao estudo das fragmentações e as informações sobre a amostra descritas na literatura, direcionaram a identificação por tentativa dos componentes da mistura de ésteres. Assim, a técnica de CG-EM possibilitou identificar os constituintes presentes da fração ácida do óleo das sementes de *C. brasiliensis*. Esta fração é constituída majoritariamente por ácidos ciclopentênicos, com destaque para os ácidos chaulmúgrico, hidnocárpico e górlico. Os espectros de massas dos ácidos ciclopentênicos majoritários estão em anexo (pág. 118) e são concordantes com aqueles encontrados na literatura e na espectroteca do massas Wiley (SPENER E MANGOLD, 1974).

Na tabela 7, pode ser observada também a presença de quatro componentes que apresentaram seus espectros de massas com perfil de fragmentação semelhante aos ácidos ciclopentênicos principais. Estes compostos, homólogos dos constituintes majoritários, são os ácidos aleprílico e aléprico, já descritos nesta espécie por Cole e Cardoso (COLE E CARDOSO, 1939), e os ácidos monoaico ($C_5H_7(CH_2)_4CH=CH(CH_2)_4COOH$), oncóbico ($C_5H_7(CH_2)_6CH=CH(CH_2)_6COOH$) e hormélico ($C_5H_7(CH_2)_{14}COOH$), os quais foram encontrados no óleo e nas folhas das espécies *C. echinata* e *H. anthelminthica* (Flacourtiaceae) (SPENER E MANGOLD, 1974).

Os compostos A, B e C (tabela 7) são substâncias desconhecidas, que eluem logo após os ésteres hidnocarpato, gorlato e chaulmugrato de metila, respectivamente. Esses compostos possuem m/z 80 como pico-base e íons moleculares com duas unidades a menos quando comparados com os íons

moleculares dos ácidos ciclopentênicos majoritários, o que sugere a presença de mais uma insaturação na sua estrutura, dentro do anel de cinco membros que se mantém ligado à cadeia lateral. A possível fragmentação para a formação do íon m/z 80 está presente na figura 39. A menor abundância do íon m/z 67 neste tipo de estrutura se justifica pela dupla do anel ligada a cadeia lateral.

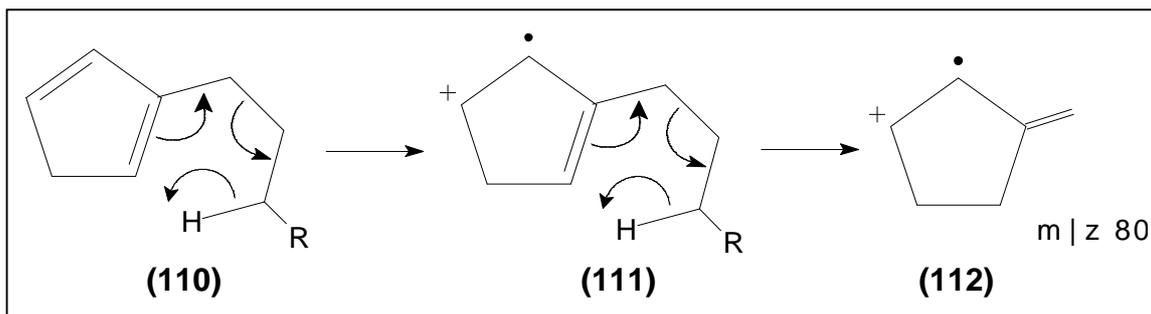


Figura 39: Fragmentação para formação do íon m/z 80 dos compostos presentes na mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*

4.1.4. Determinação da posição da ligação dupla do gorlato de metila por espectrometria de massas através de adutos de dissulfeto de dimetila

Os espectros de massas gerados por impacto de elétrons dos derivados metiltiolados a partir da mistura de ésteres metílicos de *C. brasiliensis* apresentaram os íons moleculares ($M^{+\bullet}$), além de fragmentos referentes a inserção do metiltiol ($-SCH_3$) no anel ciclopentênico. A figura 40 mostra a fragmentação proposta para estes derivados. No espectro de massas correspondente ao derivado metiltiolado do hidnocarpato de metila, por exemplo, é observado o íon molecular m/z 360 e os íons 265 (M^+-95) e 313 (M^+-47) correspondem às perdas dos fragmentos ($-CH_3SH$) e ($-SCH_3$) do anel. No espectro de massas dos derivados do chaulmugrato de metila é observado o mesmo perfil de fragmentação com a presença do íon molecular m/z 388 e os íons 341 (M^+-47) e 293 (M^+-95).

Os íons de m/z 175 e 211 confirmam a presença da insaturação na posição $\Delta 6$ na cadeia lateral do gorlato de metila (composto 3 na tabela 8). O espectro de massas deste derivado está em anexo (página 119).

O composto 4 (tabela 8) representa o derivado metiltiolado do gorlato de metila, produto da reação do dissulfeto de dimetila no anel ciclopentênico, visto que este composto possui o mesmo perfil de fragmentação dos derivados metiltiolados do ácido hidnocárpico (1 e 2 na tabela 8) e chaulmúgrico (5 e 6, na tabela 8).

O tempo de retenção e os íons principais dos derivados metiltiolados estão presentes na tabela 8. As estruturas desses íons estão indicadas na figura 40.

Tabela 8: Lista dos compostos metililados derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* após derivatização com solução de diazometano

Composto	t _r (min)	m/z íons (abundancia relativa)
1	26,88	67(100),113(76), 215(10), 233(25), 265(71), 313(59), 360 (5)
2	27,01	67(100), 113(60), 215(11), 233(24), 265(94), 313(39), 360 (2)
3	27,74	67(100),143(52),175(27),211(10),386(4)
4	28,25	67(100),113(44),291(18,)339(29),386(1)
5	28,48	67(100),113(75), 261 (28), 293(67),341(56), 388 (3)
6	28,49	67(100),113(58), 261(27), 293(71),341(47), 388 (2)

A reação com o reagente de dissulfeto de dimetila levou a formação de uma mistura de diastereoisômeros. Os compostos 1 e 2 (tabela 8) são diastereoisômeros derivados do ácido hidnocárpico e possuem os mesmos fragmentos de massas (tabela 8). O mesmo acontece para os compostos 5 e 6 (tabela 8) derivados do ácido chaulmúgrico.

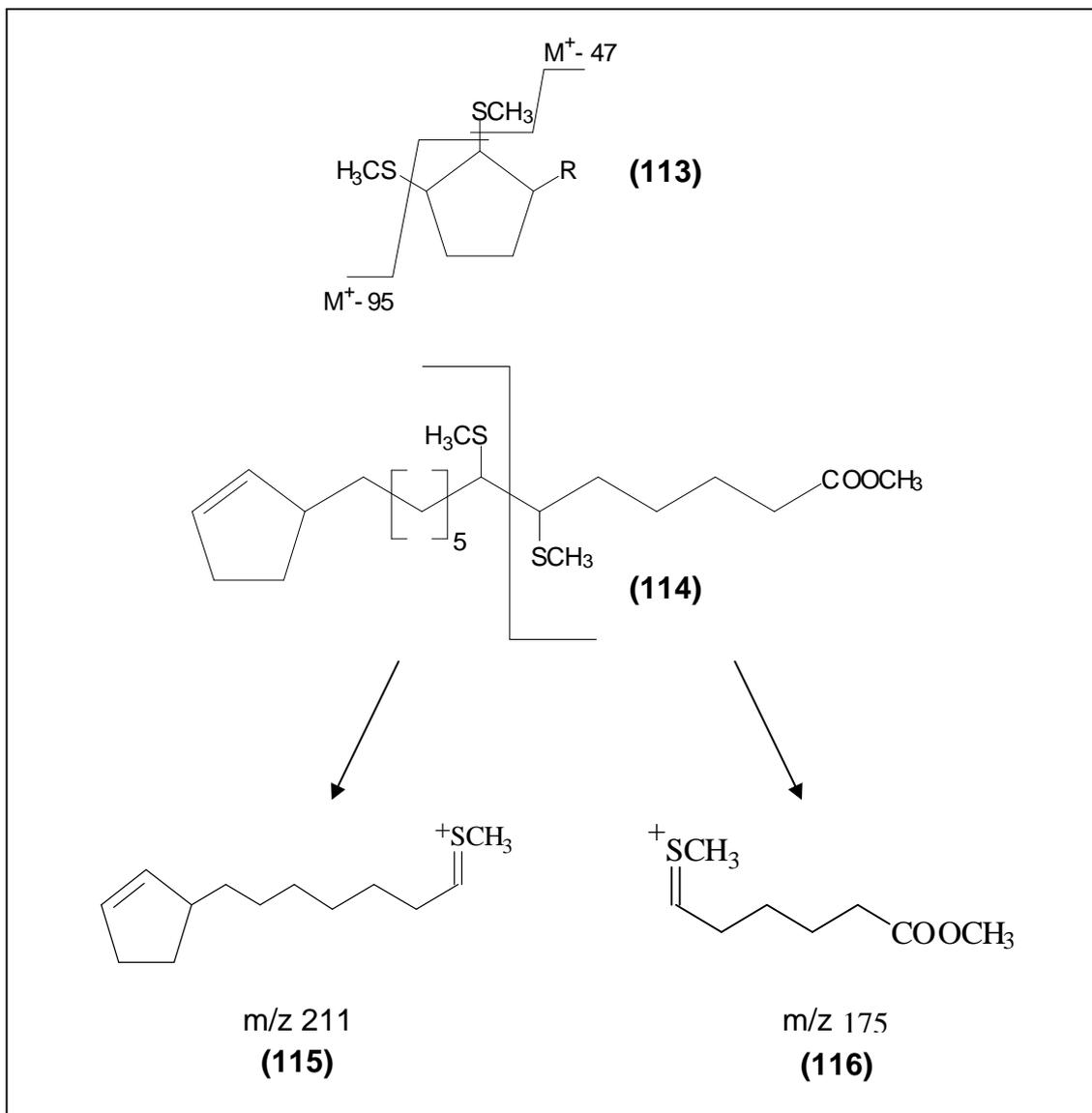


Figura 40: Perfil da fragmentação dos derivados metiltiolados da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*

Esta técnica de derivatização é importante para a determinação da posição da insaturação na cadeia lateral ligada ao anel ciclopentênico nas estruturas dos ácidos monoácido, górrico e oncóbico encontrados na fração ácida do óleo em estudo (ver tabela 7). Segundo Spener, o ácido górrico determinado nas espécies *C. echinata* e *H. anthelmintica* (Flacoutiaceae) por Paget seria uma mistura dos isômeros de posição $\Delta 6$ e $\Delta 9$, embora o primeiro se apresentasse como majoritário (PAGET, 1937; SPENER E MANGOLD, 1974).

Os resultados aqui apresentados confirmam a presença da insaturação na posição $\Delta 6$ do ácido górrico. O isômero $\Delta 9$ deste ácido não foi identificado no

óleo analisado da semente de *C. brasiliensis*. Não foi possível confirmar a posição da insaturação na cadeia lateral dos ácidos monoácido e oncóbico que se encontravam em nível de traço na mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis* (tabela 7).

4.2. Quantificação da fração ácida:

4.2.1. Quantificação da mistura de ácidos graxos do óleo de *C. brasiliensis* por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

A cromatografia gasosa deve, em parte, seu crescimento rápido durante as últimas quatro décadas à sua velocidade, à sua simplicidade, ao seu custo relativamente baixo e a sua ampla aplicação como ferramenta de separação. Entretanto, sua utilização não teria se difundido tanto se não fosse o fato dela fornecer informação quantitativa útil sobre as espécies separadas.

A cromatografia quantitativa em coluna está baseada na comparação da altura ou da área do pico do analito com a de um ou mais padrões. A quantificação do composto de interesse pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição padrão (RIBANI et al, 2004).

O método de padronização interna foi o método escolhido para a quantificação dos componentes da mistura dos ésteres metílicos. Este método consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona uma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração da substância. A relação matemática entre a razão das áreas com a concentração da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente dentro de uma determinada faixa de aplicação, podendo ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições

experimentais, pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, descrita pela equação $y = ax + b$, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al, 2004).

Utilizando a técnica de CGAR acoplada ao detector DIC, somada as informações obtidas por CGAR-EM foi possível identificar e quantificar os ácidos majoritários presentes na fração ácida do óleo de *C. brasiliensis* após esterificação com diazometano.

A tabela 9 apresenta os dados relativos à curva analítica para o padrão de elaidato de metila. O elaidato de metila foi utilizado para a construção da curva, pois não havia nenhum éster derivado de ácido ciclopentênico graxo puro para ser utilizado como padrão. Como padrão interno foi utilizado o heptadecanoato de metila por ser quimicamente similar aos compostos a que se quer quantificar, além de ter tempo de retenção próximo, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra (RIBANI et al., 2004).

A curva foi obtida por regressão linear a partir do gráfico da relação das áreas (área do composto alvo/área do padrão) e concentrações (concentração do composto alvo/concentração do padrão). Esta relação permitiu determinar o fator de resposta do elaidato de metila em relação ao padrão interno heptadecanoato de metila (Tabela 9).

$$\text{Fator de resposta} \\ \text{FR} = A_a/A_{pi} \times C_{pi}/C_a$$

{

- At= área do composto alvo (elaidato de metila)
- A_{pi}= área do padrão interno (heptadecanoato de metila)
- C_t= concentração do composto alvo (elaidato de metila)
- C_{pi}= concentração do padrão interno (heptadecanoato de metila)

Tabela 9: Dados da curva analítica do padrão de elaidato de metila

Elaidato de metila					
Concentração (µg/mL)	y médio	n	CV	x(Ct/Cis)	FR
1	0,022	3	17,0	0,02	1,116
25	0,531	3	1,7	0,5	1,062
50	1,088	3	1,2	1	1,088
100	2,131	3	9,4	2	1,065
250	5,486	3	6,2	5	1,097

Aa=área do composto alvo

Api=área do padrão interno

Ca=Concentração do composto alvo

Cpi=concentração do padrão interno

$y=Aa/Api$

$x=Ca/Cpi$

FR=fator de resposta = y/x

n= número de replicatas

CV (%)=coeficiente de variação = $100 \times \text{desvio padrão}/\text{média}^*$

Média do FR	1,086
Desv. Padrão FR	0,023
Desv. Padrão Rel.FR	0,021
Coef. Variação FR	2,085

*O aplicativo excell foi utilizado no cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação. Estes parâmetros podem ser calculados através das equações presentes nos trabalhos de SKOOG (SKOOG, 2002).

Como o padrão interno e o composto alvo (elaidato de metila) possuem propriedades físico-químicas semelhantes, o fator de resposta encontrado foi próximo de 1.

A curva de calibração obtida apresentou excelente linearidade (expresso por R^2) na faixa de concentração analisada (ver figura 41).

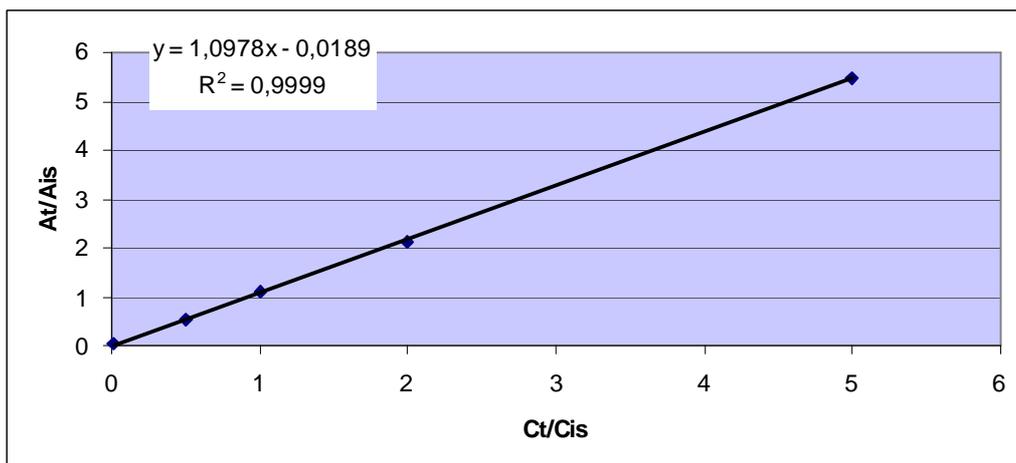


Figura 41: Curva de calibração do elaidato de metila por padronização interna em CGAR

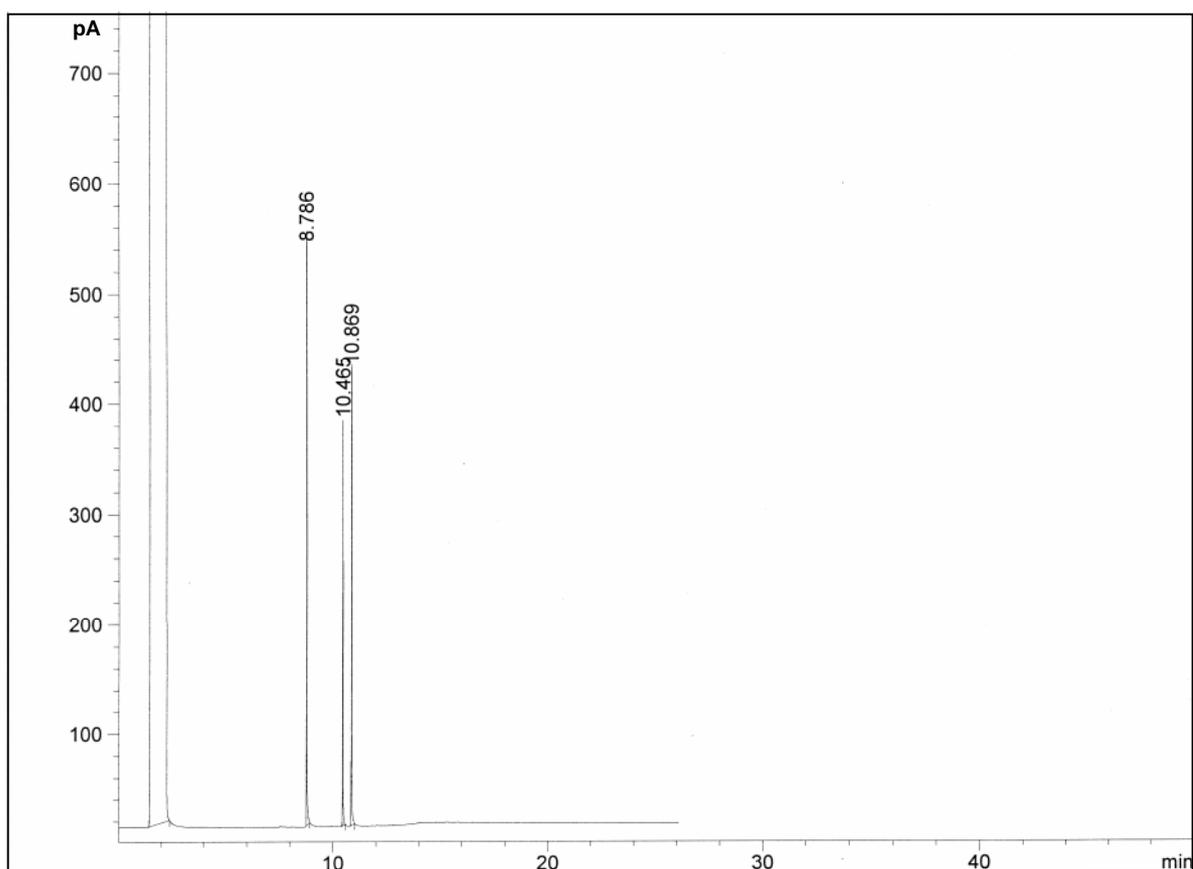


Figura 42: Cromatograma do ponto de 50 µg/mL utilizado na construção da curva analítica. (t_r 8,78 min – miristato de metila; t_r 10,46min – heptadecanoato de metila e t_r 10,86 min – elaidato de metila)

A determinação da concentração da mistura dos ésteres metílicos ciclopentênicos a partir da co-injeção com o padrão foi realizada com o uso da curva analítica. Sabendo que a expressão matemática da curva é $Y = 1,0978X - 0,0189$, sendo $Y = Aa/A_{pi}$ e $X = Ca/C_{pi}$ e conhecendo os valores de Aa , A_{pi} , C_{pi} , facilmente foi determinada a concentração dos constituintes presentes nas amostras 1, 2 e 3, contendo a mistura de ésteres metílicos nas concentrações 300, 350 e 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A composição dos principais constituintes nas três soluções está na tabela 10.

Tabela 10: Concentração dos constituintes majoritários presentes nas amostras 1, 2 e 3 contendo a mistura de ésteres metílicos derivados da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis* nas concentrações 300, 350 e 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

t_r (min)	éster metílico	Amostra 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra 3 ($\mu\text{g/mL}$)
9.92	palmitato de metila	19,5 (6,5%)	22,8 (6,5 %)	26,8 (6,7%)
10.21	hidnocarpato de metila	149,7 (49,9%)	177,1 (50,6 %)	207,6 (51,9 %)
10.83	oleato de metila	11,1 (3,7%)	12,6 (3,6 %)	14,4 (3,6%)
11.12	gorlato de metila	52,2 (17,4%)	62,65 (17,9 %)	72,8 (18,2%)
11.25	chaulmugrato de metila	55,8 (18,6%)	67,2 (19,2 %)	78,0 (19,5 %)
8,78	miristato de metila (% recuperação)	49,3 (98,6 %)	50,2 (100,5 %)	52,4 (104,9%)

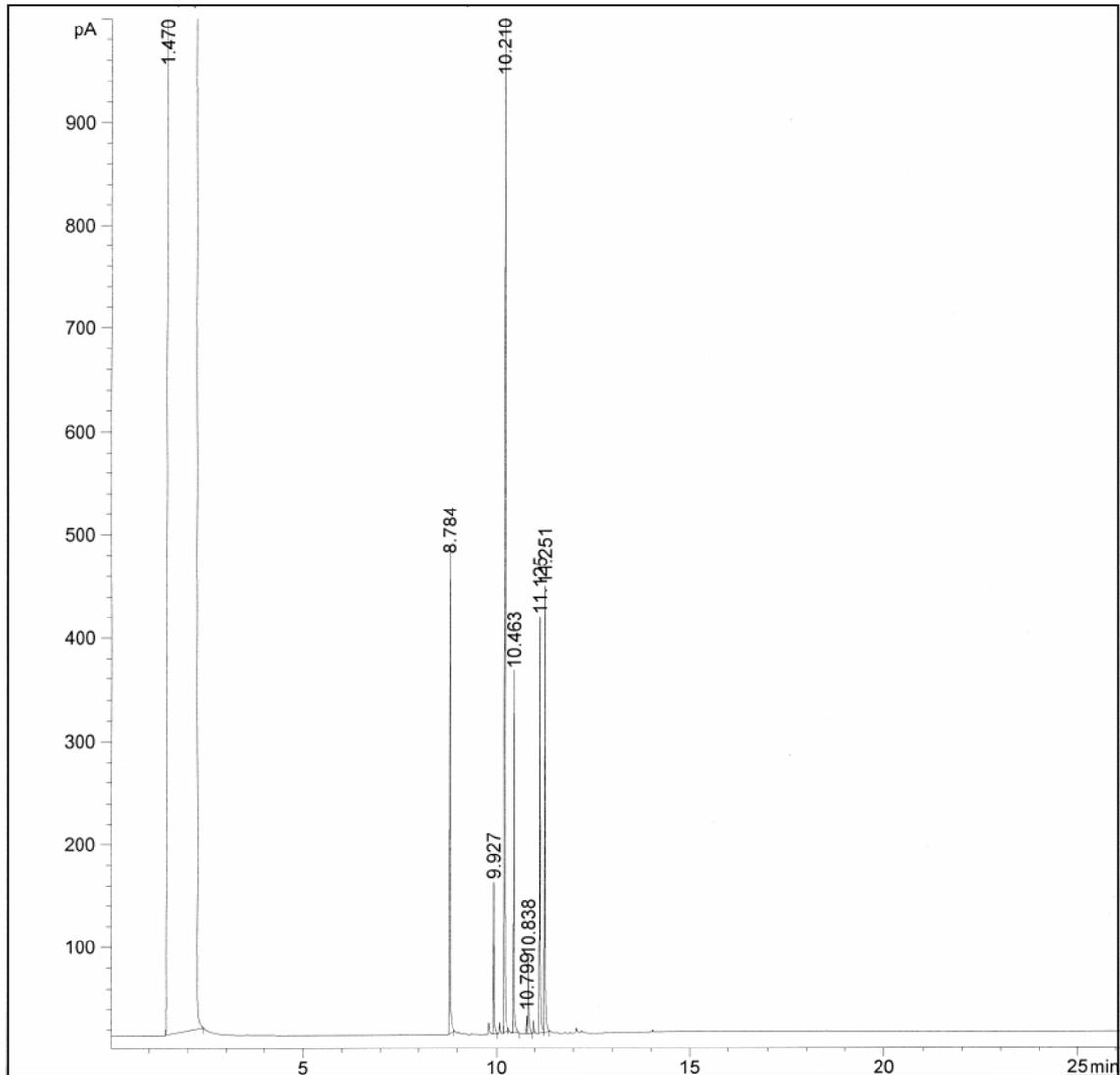


Figura 43: Cromatograma da mistura de ácidos graxos ciclopentênicos de *C. brasiliensis*

Outra maneira de quantificar é pela relação da área do padrão interno com a área do composto que se quer quantificar quando co-injetados. Conhecendo a área do padrão e a sua concentração, por simples regra de três, pode-se obter a concentração do composto alvo. Isso pode ser feito, pois tanto o padrão interno quanto os compostos possuem a mesma resposta para o detector. Os resultados obtidos utilizando esta relação foram idênticos ao da tabela 10.

Segundo Abdel-Moety, a composição química dos ácidos ciclopentênicos pode atingir cerca de 90% dos ácidos graxos totais nos diferentes óleos de chaulmugra (ABDEL-MOETY, 1981). Os resultados obtidos na quantificação por padronização interna da fração ácida de *C. brasiliensis* revelaram que a

composição destes ácidos é de 88%. Este valor corrobora o valor total de ácidos graxos encontrados na análise do óleo de sapucainha por Cole e Cardoso (COLE E CARDOSO, 1939). Estudos realizados por Spener e Mangold mostram que a proporção destes ácidos ciclopentênicos está relacionada, principalmente, com o estágio de maturação das sementes (SPENER E MANGOLD, 1974).

A fim de avaliar as perdas dos processos de derivatização e cromatográfico durante a quantificação da fração ácida, foi utilizado o ácido mirístico como padrão de recuperação. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Os resultados de recuperação de cada amostra analisada estão apresentados na tabela 11 e indicam uma boa recuperação.

O método de padronização interna, utilizado neste trabalho, é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna, fluxo de gás de arraste e tamanho da amostra (RIBANI et al, 2004).

4.2.2. Comparação da composição química da mistura de ácidos graxos do óleo de *C. brasiliensis* com frações envelhecidas do mesmo óleo

A mistura de ácidos de *C. brasiliensis* utilizada nos testes farmacológicos foi mantida sobre refrigeração durante todo o trabalho, no período de 3 anos. A fim de avaliar a estabilidade química dos constituintes desta fração, comparou-se a sua composição química com três amostras de mistura de ácidos de *C. brasiliensis*, amostras 4, 5 e 6. A amostra 4 é constituída da fração ácida extraída de sementes secas de frutos de *C. brasiliensis* recentemente coletados (Outubro de 2005). As amostras 5 e 6 são misturas de ácidos do óleo que ficaram expostas à ação da luz e temperatura ambiente (durante aproximadamente 2 e 3 anos respectivamente). Os resultados da quantificação

destas amostras (derivatizadas com diazometano) por CGAR através da técnica de padronização interna estão presentes na tabela 11. As amostras 4, 5 e 6 foram preparadas na concentração de 250 µg/mL e o padrão interno (heptadecanoato de metila) adicionado de modo a ter concentração final de 50 µg/mL.

Tabela 11: Comparação da composição de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura ácidos graxos do óleo das sementes dos frutos de *C. brasiliensis* coletados em outubro de 2001 e agosto de 2005 com amostras envelhecidas da mistura de ácidos graxos (de frutos coletados em 2001)

t _r (min)	éster metílico	Média ^{1,2,3} (%)	Amostra 4 (%)	Amostra 5 (%)	Amostra 6 (%)
9.92	palmitato de metila	6,6	3,5	7,9	5,9
10,214	hidnocarpato de metila	50,8	52,2	9,1	0,8
10.838	oleato de metila	3,7	1,3	0,9	0,6
11.12	gorlato de metila	17,8	20,3	2,2	1,38
11.25	chaulmugrato de metila	19,1	19,3	3,8	2,19
	Total	98	96,6	23,9	10,87

O resultados mostraram que o armazenamento sob refrigeração em frasco âmbar, permitiu com que a fração ácida se mantivesse estável no período de 3 anos (amostras 1, 2, 3), visto que a sua composição se apresentou bastante semelhante aquela dos frutos frescos (amostra 4). Nos trabalhos de Paget, Cole e Cardoso já havia sido relatado que o óleo da chaulmugra brasileira se mantinha estável no período de um ano e que o ácido górrico seria o ácido mais instável dentre os ácidos desta fração (PAGET, 1937; COLE E CARDOSO, 1939). Embora a amostra mantida sob refrigeração seja de um extrato diferente da amostra 4, ambas apresentaram quantidade de ácido górrico na mesma proporção do ácido chaulmúgrico. Nas amostras da fração ácida envelhecida (amostras 5 e 6) foi observada não apenas a degradação do ácido górrico, como também dos ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico. A fim de identificar os produtos oriundos desta degradação, a misturas de ácidos graxos da semente de *C. brasiliensis* que ficaram sobre a bancada (amostras 5 e 6) foram esterificadas com diazometano e injetada no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas estão presentes nas figura 44 e 45.

Os produtos de degradação destas amostras foram tentativamente identificados com base nos espectro de massas obtidos, além das técnicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e IV.

A técnica de CGAR-EM permitiu identificar um perfil característico com a presença de três famílias de compostos que surgem com o envelhecimento. A primeira família pode ser representada principalmente pelos íons de m/z 82 (pico-base), 95 a segunda pelos íons m/z de 82 (pico-base), 95 e 109 e a última pelos íons 96 (pico-base) e 109. Esta última família é predominante na amostra mais envelhecida (amostra 6). Os fragmentos dos principais compostos presentes nas amostras degradadas estão na tabela 12.

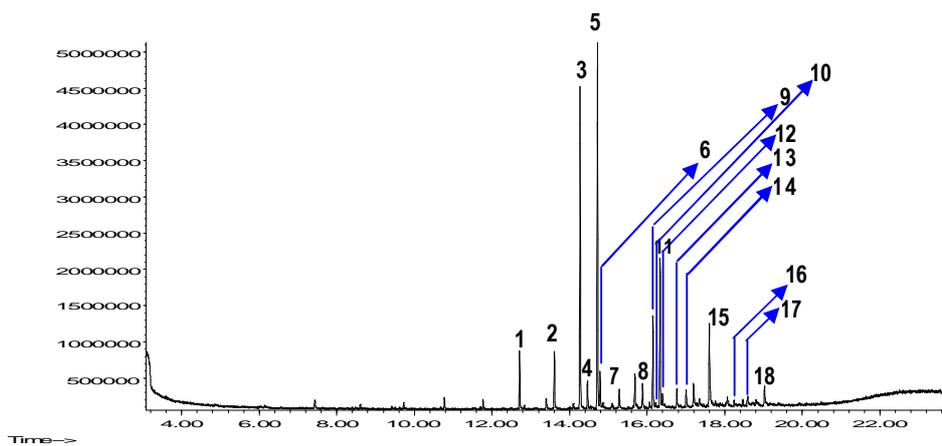


Figura 44: Cromatograma da amostra 05 contendo os produtos de degradação da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* (método CB-03, descrito no item 3.1.3)

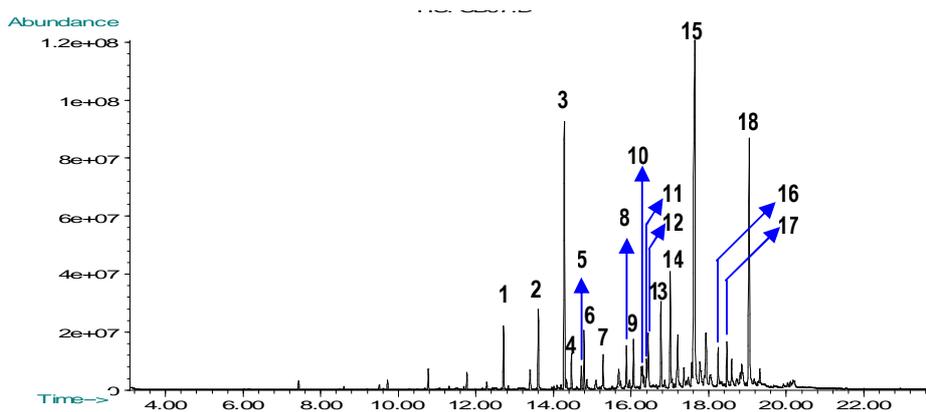


Figura 45: Cromatograma da amostra 06 contendo os produtos de degradação da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* (método CB-03, descrito no item 3.1.3)

Tabela 12: Principais compostos oriundos da degradação da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*

Composto	Tr (min)	m/z íons (abundancia relativa)
1	12,71	55(89), 74(89), 84(55), 98(100), 139(47), 171(31), 213(43), 244(1)
2	13,6	55(71), 74(73), 84(50), 98(100), 112(33), 153(30), 185(26), 227(35), 258(1)
3	14,27	74(100), 87(77), 239(17), 270(27)
4	14,46	55(73), 74(76), 84(50), 98(100), 112(29), 199(22), 241(25), 272(1)
5	14,72	67 (100), 82 (23), 235 (8), 266(5).
6	14,78	67(7), 80 (100), 93 (31), 233(7), 264(11)
7	15,27	55(60), 74(63), 84(43), 98(100), 112(27), 213(17), 255(20), 286(1)
8	15,88	74(100), 87(68), 255(30), 267(11), 298(29)
9	16,15	67 (100), 80 (46), 261(2), 292(6).
10	16,21	67(6), 80 (100), 93 (33), 259(6), 290(11)
11	16,33	67 (100), 82 (49), 263 (6), 294(4).
12	16,40	67(5), 80 (100), 93 (32), 261(8), 292(12)
13	16,76	55(16), 82(100), 95(22), 280(1)
14	17,00	55(41), 82(100), 95(60), 96(48), 109(28), 249 (13), 263(2), 280(1)
15	17,61	55(71), 96(99), 109(100), 249(34), 263(3), 280(9)
16	18,23	55(10), 82(100), 95(14), 277(2), 308(1)
17	18,46	55(51), 82(100), 95(77), 96(52), 109(32), 235 (20), 276(14), 277(12), 308(1)
18	19,03	55(51), 96(99), 109(100), 235(44), 248(6), 277(16), 308(5)

Os cromatogramas revelam que o envelhecimento proporciona o surgimento de compostos polares de maior peso molecular que os ácidos ciclopentênicos. O cromatograma da amostra 6 (figura 45) apresenta dois compostos principais com tempos de retenção em 17, 61 e 19,03 (min).

O espectro de infravermelho desta amostra (em anexo, pág. 120) apresentou sinais de deformação axial de C=O de ésteres em 1739 cm^{-1} e C=O de cetona cíclica conjugada, em 1676 cm^{-1} (NEGISHI et al, 1996). A vibração de deformação axial da ligação C=C (conjugada com a função cetona) produz uma banda de absorção fraca em 1616 cm^{-1} (NEGISHI et al, 1996) e as bandas de vibrações de deformação axial de C-O de ésteres estão presentes em 1173 e 1197 cm^{-1} .

A análise do espectro de RMN¹³C da amostra 6 (em anexo, pág. 121) evidenciou o aparecimento dos carbonos sp² de cetona cíclica α,β insaturada em δ 209,83 e de éster em δ 174, 4. Os deslocamentos químicos em δ 129, 5 e 183,4 se referem aos carbonos sp², o primeiro adjacente a carbonila e o

segundo ligado a cadeia lateral (NEGISHI et al, 1996). O carbono sp^3 adjacente a carbonila está localizado em δ 35,40. Estes deslocamentos de ciclopentenonas são apresentados no trabalho de NEGISHI (NEGISHI et al., 1996).

A análise do espectro de RMN¹H (em anexo, pág.122) evidenciou o aparecimento do sinal de hidrogênio olefínico em δ 5,88. O deslocamento em δ 3,6 se refere aos hidrogênios da metila ligada a carbonila da função éster. Os deslocamentos dos hidrogênios ligados aos carbonos sp^3 do anel ciclopentênico estão na região de δ 2,23 - 2,33.

Os produtos derivados da oxidação destes compostos ciclopentênicos já foram propostos no trabalho de Paget como sendo hidroxí e ceto ácidos (PAGET, 1937). Reunindo estas informações com aquelas obtidas com a análise dos espectros de massas, RMN e IV da amostra 6, pode-se propor uma estrutura para os compostos majoritários, conforme apresentada na figura 46.

A possível fragmentação para a formação dos íons estáveis m/z 96 e 109 está indicada na figura 46. No trabalho de Grechkin, estes mesmos fragmentos foram determinados para algumas ciclopentenonas (GRECHKIN et al, 2002). Embora as ciclopentenonas estudadas por GRECHKIN sejam dissubstituídas, pode-se sugerir um comportamento de fragmentação semelhante após a quebra de uma das cadeias laterais.

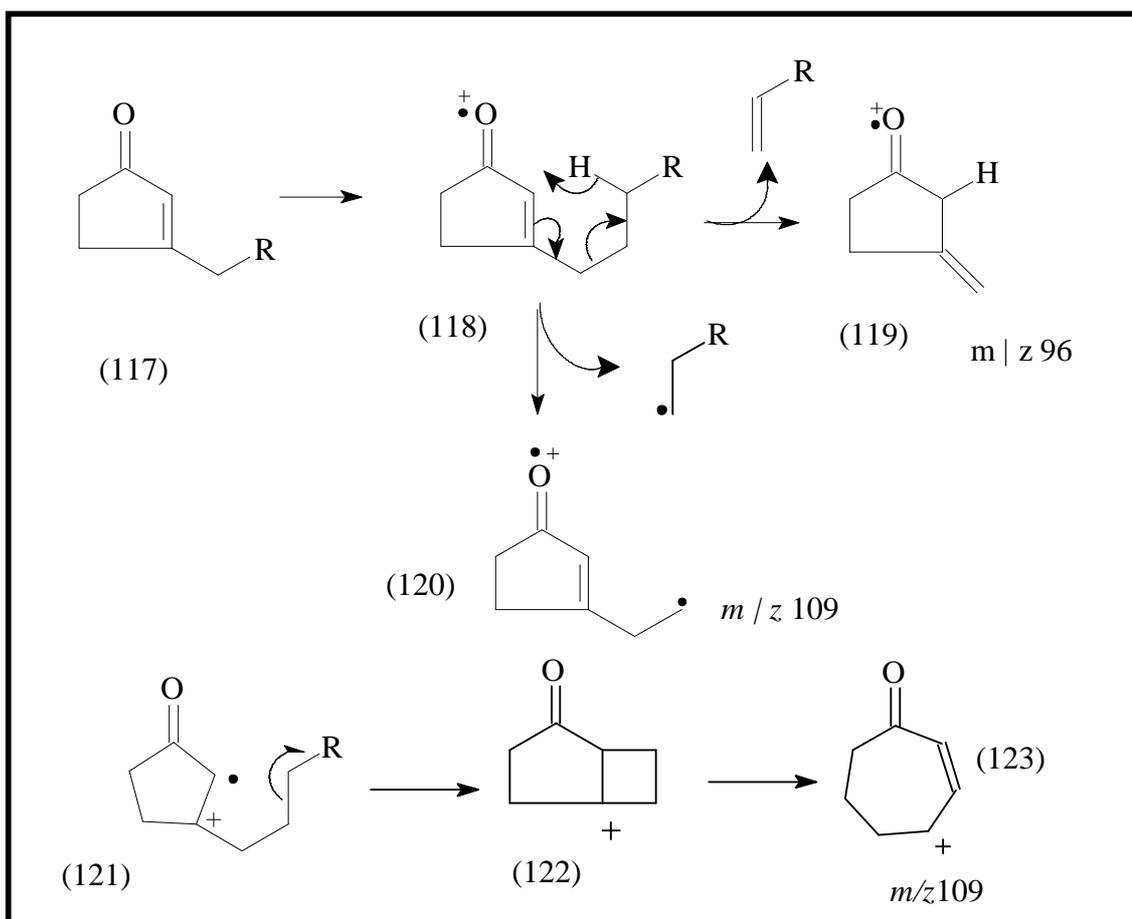


Figura 46: Fragmentação para formação dos íons m/z 96 e 109.

Os espectros de massas dos compostos 15 e 18 (tabela 12), majoritários na mistura degradada de ácidos graxos de *C. brasiliensis* (amostra 6), além de revelarem uma abundância relativa significativa para os íons de m/z 96 e 109, apresentaram os seus íons moleculares de m/z 280 e 308, respectivamente. O composto 15, mais abundante nesta mistura, possivelmente se originou da oxidação do ácido hidnocárpico (composto 5 na tabela 12) e o composto 18, que possui 28 unidades de massa a mais que o composto 15, é derivado do ácido chaulmúgrico (composto 11 na tabela 12). Para o composto 15, $R = -C_{11}O_2H_{21}$ na estrutura 117 (figura 46) e para o composto 18, $R = -C_{13}O_2H_{25}$ (figura 46).

A técnica de CGAR-EM permitiu também a identificação nas amostras 5 e 6 de uma série homóloga de ésteres metílicos originários de ácidos dicarboxílicos lineares na faixa de C11 a C14 (compostos 1, 2, 4 e 7 na tabela 12), além de outros produtos (não identificados) derivados da reação de

oxidação dos ácidos ciclopentênicos. Os espectros de massas dos diésteres obtidos da mistura foram comparados com os espectros de massas da espectroteca Wiley 275, o que possibilitou a identificação dos ésteres metílicos derivados dos ácidos undecanodióico, (composto 1 da tabela 12), dodecanodióico (composto 2 da tabela 12), tridecanodióico (composto 4 da tabela 12) e tetradecanodióico (composto 7 da tabela 12). É importante destacar que diácidos graxos também foram apresentados nos trabalhos de Paget (PAGET, 1937).

4.3. Coleção de moléculas oxidadas a partir da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*

Nos últimos anos, tem sido crescente o número de coleções de moléculas orgânicas estruturalmente diversas baseadas em produtos naturais. O poder do exemplo natural dos processos combinatórios inspirou químicos e bioquímicos a aplicarem a química combinatória para a formação destas coleções. “A natureza utiliza uma abordagem dinâmica para produzir um número imenso de moléculas que acompanham o complexo processo de vida dos organismos”. Diferentemente do químico convencional, que sintetiza e caracteriza uma molécula de cada vez, a natureza delinea uma vasta biblioteca combinatória (“library”), a partir de um conjunto de moléculas precursoras (“building blocks”) e testa (“screening”) os componentes dessa biblioteca em relação às propriedades desejadas (ESTRADA et al, 2005).

As coleções combinatórias preparadas com o intuito de se identificar um composto de valor terapêutico, em geral, possuem milhares de substâncias que são testadas sob a forma de misturas de componentes, o que permite rapidez neste processo (ESTRADA et al, 2005). Na busca de estruturas bioativas, foi realizada a síntese de derivados oxidados a partir da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis*, dando origem a uma coleção de moléculas estruturalmente relacionadas.

4.3.1. Caracterização da biblioteca de epóxidos

A reação de epoxidação dos ésteres metílicos possibilitou a criação de uma biblioteca contendo pelo menos 5 compostos principais. Os produtos foram caracterizados segundo as técnicas espectrométricas.

Espectrometria no Infravermelho:

No espectro de infravermelho (em anexo, pág. 123) pode ser observada uma banda de deformação axial de C-H de carbono sp^3 de epóxido em 3019 cm^{-1} . Não foram observadas as bandas 3050 cm^{-1} e 1651 cm^{-1} referentes as bandas de deformação axial de =C-H e C=C, respectivamente. A absorção em 846 cm^{-1} é atribuída à deformação axial assimétrica do anel, em que a ligação C-C aumenta e a ligação C-O se contrai. A banda 809 cm^{-1} , que aparece entre pode ser atribuída à “banda de 12 microns”, característica da função epóxido (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

A análise do espectro de RMN ^1H (em anexo, pág. 124) evidenciou o desaparecimento do sinal em δ 5,65 devido aos dois hidrogênios olefínicos, apresentando sinais próximos de δ 3.40, atribuído aos hidrogênios da função epóxido (LOPES, 1982).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (em anexo, pág.125) evidenciou o desaparecimento do sinal de carbono sp^2 em δ 130. É possível observar também o sinal de carbono sp^3 da função epóxido no anel em δ 56,56, 56,79, 59,29 e 60,42 (GUSTONE, 1993).

Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

A mistura de ésteres dos ácidos ciclopentênicos foi oxidada pelo ácido m-cloroperbenzóico (AMCPB) em clorofórmio, a uma temperatura de aproximadamente de 5°C. Obteve-se assim, após isolamento em coluna cromatográfica em gel de sílica, uma mistura diastereoisomérica dos epóxidos na forma de um óleo incolor. Esta mistura foi analisada por CGAR-EM. O cromatograma da corrente iônica total (CIT), obtido através do uso da coluna DB5-MS de acordo com o método CB-03, nas condições cromatográficas especificadas no item 3.1.3, apresenta um maior tempo de retenção para os compostos epoxidados comparado com os respectivos ésteres insaturados, quando injetados nas mesmas condições cromatográficas (figura 47).

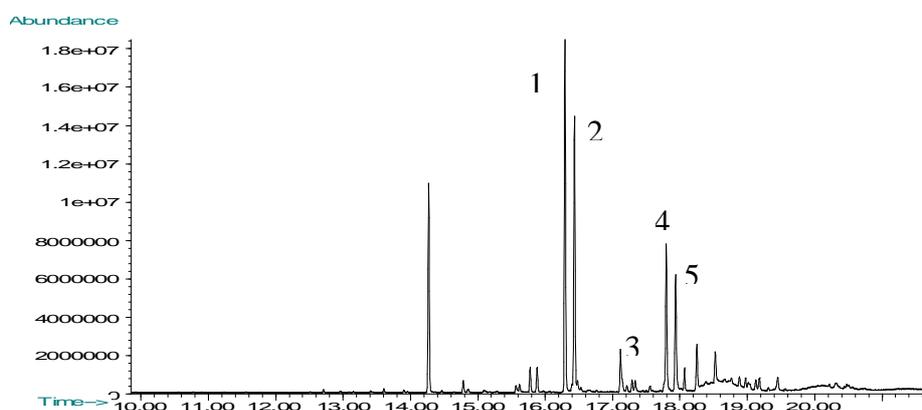


Figura 47: Cromatograma da mistura de epóxidos derivados dos ésteres metílicos da fração ácida de *C. brasiliensis* (método CB-03, descrito no item 3.1.3)

A espectrometria de massas possibilitou a aquisição dos espectros de cada um dos constituintes presentes na mistura de epóxidos. Os espectros de massas dos constituintes apresentaram íons em m/z 282, 308 e 310 correspondem aos íons moleculares dos ésteres metílicos dos ácidos hidnocárpico, górlico e chaulmúgrico, respectivamente, após a incorporação de 16 unidades de massa atômica. A tabela 13 apresenta os íons principais dos compostos formados.

A presença da função epóxido é indicada principalmente pela presença dos íons m/z 83 e 97, conforme apresentada por Lopes (LOPES, 1982). A proposta para as principais fragmentações está presente na figura 48.

Tabela 13: Produtos da reação de epoxidação da mistura de ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*

Composto	t _r (min)	m/z íons (abundancia relativa)
1	16,29	55(95), 74(34), 82(56), 83(87), 87(40), 97(100), 282(1)
2	16,43	55(92), 74(33), 82(21), 83(65), 87(37), 97(100), 282(1)
3	17,11	55(100), 74(21), 83(32), 82(21), 87(40), 155(76), 308(1)
4	25,34	55(85), 74(25), 82(20), 83(64), 87(30), 97(100), 310(1)
5	25,55	55(85), 74(29), 82(21), 83(57), 87(29), 97(100), 310(1)

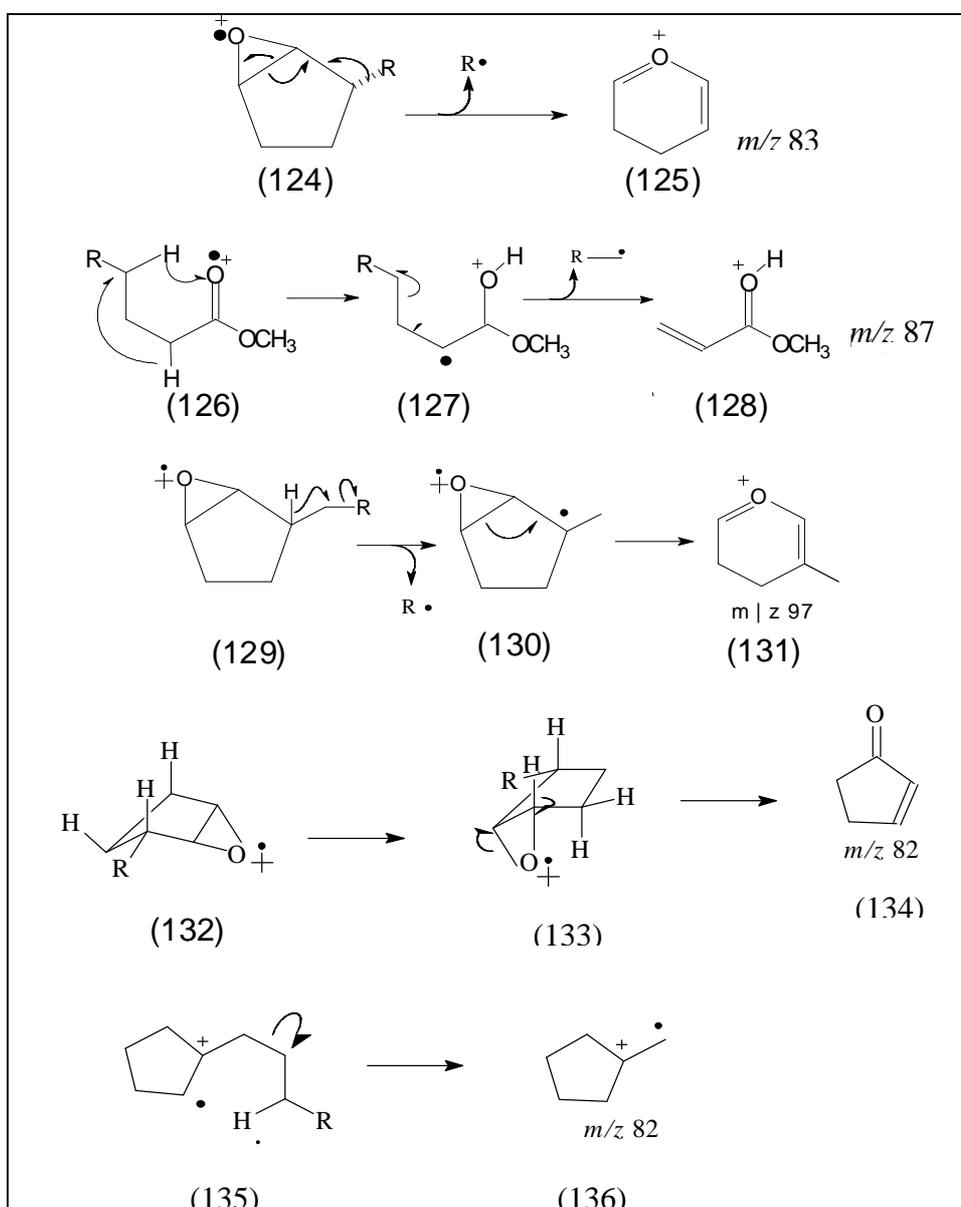


Figura 48: Esquema de fragmentação da mistura dos epóxidos

4.3.2. Caracterização da biblioteca de álcoois

O produto da hidroboração da mistura de ácidos de *C. brasiliensis* foi analisada por espectrometria de IV, RMN e CGAR-EM.

Espectrometria no Infravermelho:

No espectro de infravermelho (em anexo, pág. 126) pode ser observada uma banda de deformação axial de O-H em 3346 cm^{-1} . Pode ser observada também a ausência das bandas 3050 cm^{-1} e 1561 cm^{-1} referentes as bandas de deformação axial de =C-H e C=C, respectivamente. A banda de deformação axial de C=O devido à formação do dímero de ácidos carboxílicos está presente em 1709 cm^{-1} .

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

A análise do espectro de RMN ^1H (em anexo, pág. 127) não apresentou sinal em δ 5,65 devido aos dois hidrogênios olefínicos, apresentando sinais múltiplos na região de δ 3,5 e 4,0 atribuído ao deslocamento do hidrogênio ligado ao carbono carbinólico do ciclopentano.

Foi observada, no espectro de RMN ^{13}C (em anexo, pág. 128) a presença de carbono sp^3 ligado a hidroxila através do deslocamento químico na região de δ 75,03 e δ 62,91 (SILVERSTEIN et al., 2000).

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

O produto da hidroboração foi esterificado com diazometano e analisado por CGAR-EM. O cromatograma da corrente iônica total (CIT), obtido através do uso da coluna DB5-MS de acordo com o método CB-03, segundo as condições cromatográficas especificadas no item 3.1.3, apresenta um maior tempo de retenção para os compostos hidroxilados comparado com os respectivos ésteres insaturados, quando injetados nas mesmas condições cromatográficas. O cromatograma está representado na figura 49.

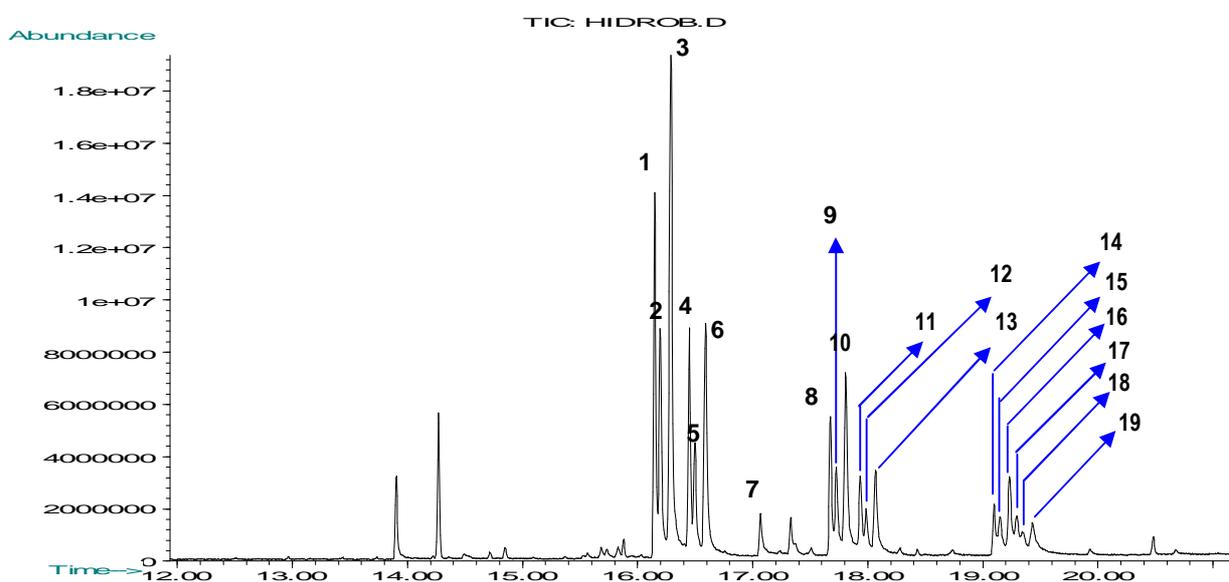


Figura 49: Cromatograma da mistura de álcoois derivados dos ésteres metílicos da fração ácida de *C. brasiliensis* (método CB-03, descrito no item 3.1.3)

A espectrometria de massas possibilitou a aquisição dos espectros de cada um dos constituintes presentes na mistura de epóxidos. Os espectros de massas dos constituintes apresentaram os íons de m/z 284, 310 e 312 correspondentes aos íons moleculares dos ésteres metílicos dos ácidos hidnocárpico, górrico e chaulmúgrico, respectivamente, após a incorporação de uma molécula de água. É comum a presença de íons referentes a perda da molécula de água $[M-18]^+$.

Os principais íons presentes nesta coleção de moléculas estão indicados na figura 50.

Tabela 14: Produtos da reação de hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*

Composto	tr	m/z íon(abundância relativa)
1	16,14	55(98), 67(74), 81(51), 82(100), 95(47), 96(54), 109(17), 266(1)
2	16,20	55(98), 67(73), 81(55), 82(100), 95(52), 96(53), 109(18), 266(1), 284(1)
3	16,29	55(98), 67(100), 81(71), 82(82), 95(75), 96(68), 109(15), 266(1), 284(1)
4	16,44	55(100), 67(62), 81(54), 82(88), 95(50), 96(82), 109(12), 266(2), 284(2)
5	16,50	55(99), 67(82), 81(60), 82(100), 95(60), 96(90), 109(18), 266(3), 284(2)
6	16,59	55(100), 67(90), 81(72), 82(75), 95(75), 96(42), 109(15), 266(4)
7	17,00	55(100), 66(52), 69(90), 81(86), 82(30), 83(88), 95(52), 109(10), 310(1)
8	17,67	55(98), 67(75), 81(49), 82(100), 95(46), 96(54), 109(17), 294(1)
9	17,72	55(98), 67(73), 81(56), 82(100), 95(52), 96(53), 109(16), 294(2), 312(2)
10	17,80	55(100), 67(87), 81(65), 82(93), 95(66), 96(60), 109(17)
11	17,93	55(100), 67(65), 81(51), 82(89), 95(47), 96(87), 109(16), 294(2), 312(3)
12	17,98	55(98), 67(65), 81(67), 82(100), 95(66), 96(87), 109(12), 294(3)
13	18,00	55(100), 67(92), 81(71), 82(72), 95(77), 96(45), 109(12), 294(3)
14	19,09	55(75), 67(86), 81(92), 82(56), 95(100), 96(30), 109(20)
15	19,15	55(81), 67(79), 81(88), 82(67), 95(100), 96(30), 109(25)
16	19,23	55(65), 67(68), 81(82), 82(51), 95(100), 96(25), 109(22)
17	19,28	55(80), 67(97), 81(100), 82(51), 95(98), 96(27), 109(20)
18	19,35	55(100), 67(83), 81(72), 82(43), 95(96), 96(30), 109(17)
19	19,42	55(78), 67(82), 81(100), 82(30), 95(67), 96(21), 109(12)

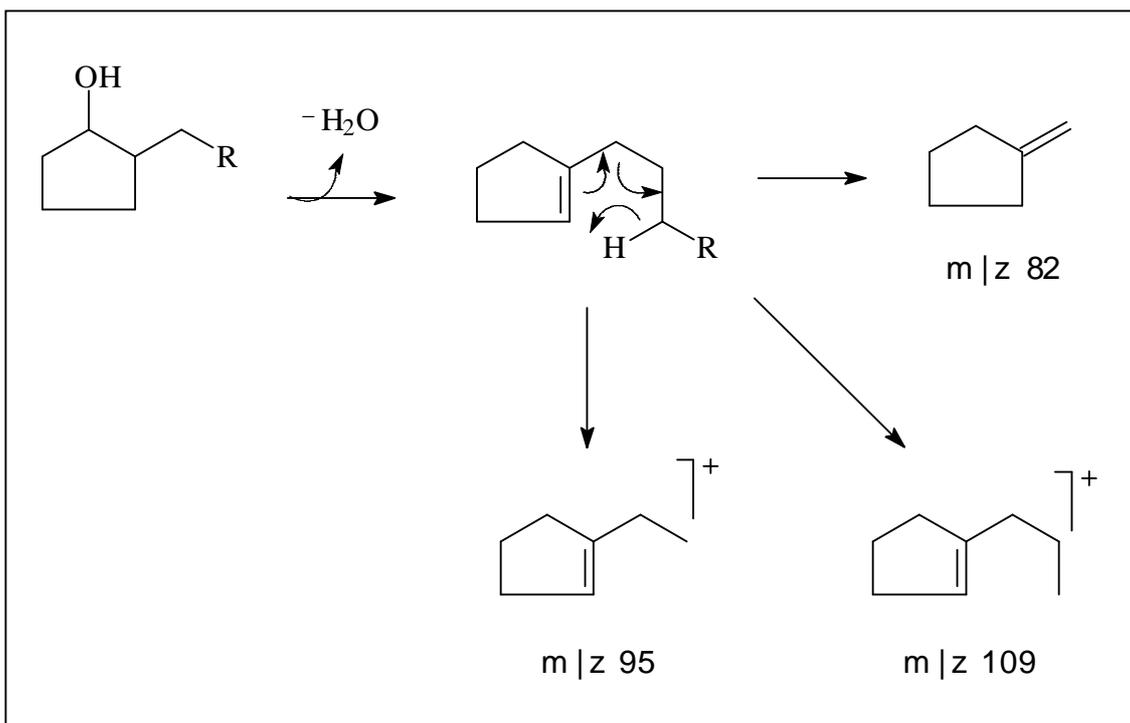
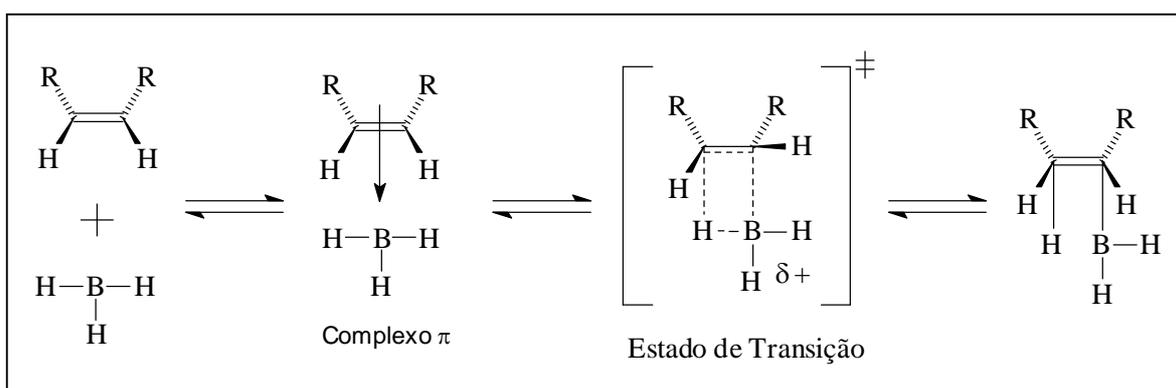


Figura 50: Esquema de fragmentação dos produtos de hidroboração

O estado de transição da hidroboração exige que o átomo de boro e o átomo de hidrogênio se adicionem na mesma face da dupla ligação, ou seja, adição sin. A etapa da oxidação na síntese dos álcoois por hidroboração – oxidação ocorre com retenção de configuração, pois o grupo hidroxila substitui o átomo de boro no composto organoborado (esquema 3).



Esquema 3: Esquema geral do mecanismo de hidroboração

O resultado destas etapas (hidroboração e oxidação) no anel ciclopenteno dos ácidos graxos presentes no óleo da semente de *C. brasiliensis* levou a formação de uma mistura de diastereoisômeros. Teoriamente, esperava-se a formação de 4 diastereisômeros derivados de cada um dos ácidos

ciclopentênicos majoritários quando ocorre a inserção na dupla do anel. Além dos 4 diastereoisômeros oriundos do ácido górrico, pode-se ocorrer ainda, a formação de produtos da reação na dupla da cadeia lateral. Contudo, foram identificados 3 grupos contendo pelo menos 6 compostos. O primeiro grupo são isômeros (componentes 1 a 6 na tabela 14) derivados da oxidação do ácido hidnocárpico cujo íon molecular é m/z 284. O grupo de isômeros derivados do ácido chaulmúgrico compreende os compostos de 8 a 13 na tabela 14 de peso molecular 312.

Pode ter ocorrido também a formação de dióis, indicada pela presença de carbono sp^3 , ligado a hidroxila e adjacente a carbono carbinólico, na região de $\delta 75,03$ e $\delta 81,00$ (SILVERSTEIN et al, 2000) no espectro de RMN de ^{13}C .

Como os constituintes da mistura de ácidos e os produtos oxidados derivados das reações de epoxidação e hidroboração possuem semelhanças estruturais com as prostaglandinas, estes compostos foram avaliados para uma possível atividade antiinflamatória.

4.4. INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO ÁCIDA DE *C. brasiliensis*

4.4.1. Atividade Antiinflamatória

4.4.1.1. Avaliação da atividade antiinflamatória da mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* através do teste do edema de pata de rato induzido por carragenina

A atividade antiinflamatória do óleo de *C. brasiliensis* foi determinada, *in vivo*, utilizando-se o teste do edema de pata de rato induzido por carragenina (RIBEIRO et al, 1998).

Estruturalmente as carrageninas são complexos grupos de polissacarídeos compostos por unidades monoméricas de galactose, podendo ser de três tipos: lambda, kappa e iota. A forma lambda, por não apresentar um gel muito viscoso em temperatura ambiente, é injetada para induzir uma resposta inflamatória. A inflamação induzida pela carragenina, originalmente descrita por Winter, é aguda, não imune, bem pesquisada e altamente reprodutível (MORRIS, 2003). Os principais sinais da inflamação – edema, hiperalgesia, eritema - se desenvolvem imediatamente após a injeção subcutânea de carragenina, resultado da ação de agentes pró-inflamatórios. A resposta inflamatória é usualmente quantificada pelo aumento do tamanho da pata do animal, ou seja, do edema.

Os resultados obtidos na determinação da atividade antiinflamatória no teste do edema de pata de rato induzida por carragenina para a mistura de ácidos graxos de *C. brasiliensis* estão presentes na figura 51.

A fração ácida, testada nas doses de 10, 50, 100, 200 e 500 mg/kg apresentou um efeito de dose e tempo dependente. A dose de 10 mg/kg não apresentou atividade antiinflamatória. As doses de 50 e 100 mg/kg inibiram o edema duas horas após a injeção de carragenina, alcançando um máximo de inibição na quarta hora (31,6 % e 29,2%, respectivamente). Com o aumento da dose para 200 e 500 mg/kg foi observada uma inibição significativa a partir da 1ª hora até a 3ª hora, apresentando um máximo de inibição na segunda hora (41,3 e 44,1%, respectivamente).

Quanto à atividade ulcerogênica, não foi observada irritação gástrica em nenhuma das doses testadas.

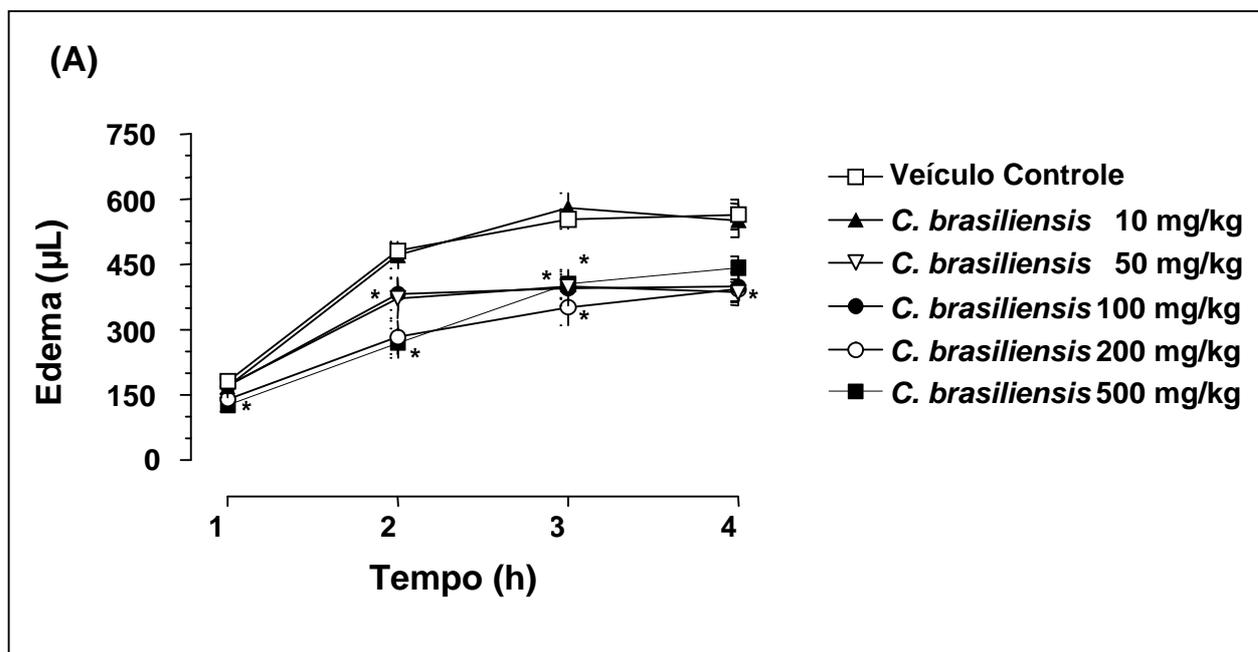


Figura 51: Efeito da fração ácida do óleo das sementes de *C. brasiliensis* administrada oralmente no teste do edema de pata de rato induzido por carragenina

O desenvolvimento do edema induzido por carragenina corresponde aos eventos mediados por histamina, bradicinina e prostaglandinas (VINEGAR, TRUAUX E SELPH, 1976; DERAEDT et al, 1976, DERAEDT et al, 1980). No entanto, é bem descrito que na 3ª hora, o pico inflamatório ocorre principalmente graças a ação de prostaglandinas. A ação da mistura de ácidos graxos nesta fase sugere uma maior seletividade na inibição destes mediadores envolvidos neste último estágio da inflamação. Relacionando as doses maiores (200 e 500 mg/kg), observou-se um efeito não específico, uma vez que a atividade antiinflamatória foi observada desde a 1ª hora.

4.4.1.2. Atividade antiinflamatória dos produtos de oxidação da fração ácida de *C. brasiliensis*

Os resultados obtidos na determinação da atividade antiinflamatória no teste do edema de pata de rato induzida por carragenina para os produtos de oxidação estão presentes na tabela 15.

Os produtos de oxidação foram administrados, por via oral, na dose de 200 mg/kg. Nesta dose, os derivados epóxidos, mas não os álcoois apresentaram atividade antiinflamatória estatisticamente significativa (17,1%) conforme pode ser observado na tabela 15.

Quanto à atividade ulcerogênica, não foi observada irritação gástrica.

Tabela 15: Efeito dos produtos de oxidação derivados da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* no teste do edema de pata de rato induzido por carragenina

	n	MÉDIA ± ERRO	% INIBIÇÃO
VEÍCULO	11	593,5 ± 24,3	-
MISTURA ALCOOL	7	516,6 ± 30,1	12,9
EPOXIDAÇÃO	7	492,0 ± 22,7	17,1*

* P < 0,05 teste t de student,

Os resultados do teste da inflamação de pata de rato induzida por carragenina revelaram que as coleções de moléculas se apresentaram como agentes antiinflamatórios menos eficazes que os ácidos ciclopentênicos. Possivelmente a insaturação do anel seja importante para a atividade destas estruturas sobre os mediadores da inflamação.

4.4.2. Atividade Analgésica

4.4.2.1. Teste da contorção abdominal induzida por ácido acético

Na tabela 16 estão os resultados obtidos da atividade antinociceptiva da mistura de ácidos de *C. brasiliensis*. A administração oral da mistura de ácidos nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentou uma inibição dose-dependente na contorção abdominal induzida por ácido acético de 27,9 e 56,9% respectivamente. A indometacina apresentou inibição de 44.5 % na dose de 10 mg/kg quando administrada via oral.

Tabela 16: Efeito da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis* e da indometacina na contorção abdominal induzida por ácido acético

Composto	Dose ^a (mg/kg)	N ^b	Número de Contorções (média ± erro padrão)	Inibição ^c (%)
Veículo Controle (Tween/EtOH/H ₂ O) (2:2:20)	-	08	73.4 ± 4.8	-
Indometacina	10	10	40.7 ± 4.4	44.5 *
Fração ácida	100	11	52.9 ± 1.7	27.9 *
	200	09	31.6 ± 3.1	56.9 *

^aDose administrada via oral. ^bn = número de animais. ^c% de inibição obtida por comparação com o grupo veículo controle. *Os resultados são expressos em média ± erro padrão de "n" animais por grupo. Os dados foram analisados usando o teste "t" de Student para um nível de significância de *p<0,05

A contorção induzida por ácido acético em camundongos é resultante da reação inflamatória aguda relacionada com o aumento dos níveis de PGE₂ e PGF₂α no fluido peritonial (VINEGAR, TRUAUX E SELPH, 1976; DERAEDT et

al, 1976, DERAEDT et al, 1980). A mistura de *C. brasiliensis* foi capaz de inibir as contorções, promovendo um efeito antinociceptivo periférico, provavelmente por estar interferindo com a fase aguda do processo inflamatório.

4.4.2.2. Teste da placa quente (“hot plate”)

Na dose de 100 mg/kg, a mistura de ácidos não afetou o tempo de latência no “hot plate”, uma vez que a latência do grupo controle foi de 8.5 ± 0.9 s e o do grupo que recebeu a fração ácida foi de 9.6 ± 0.7 s, não sendo estatisticamente significativo.

No teste do “hot plate”, comumente usado para avaliar drogas com ação analgésicas centrais (BEIRITH et al., 1998), a fração ácida não apresentou ação analgésica, reforçando que o efeito antinociceptivo está relacionado à sua ação antiinflamatória observada.

4.4.2.3. Teste da Formalina

As doses de 200 mg/kg da mistura de ácidos e de 10 mg/kg de indometacina inibiram significativamente (55,3 e 52,5%, respectivamente) a segunda fase (fase inflamatória) e não a primeira fase (fase neurogênica) no teste da dor induzida por formalina (figura 52).

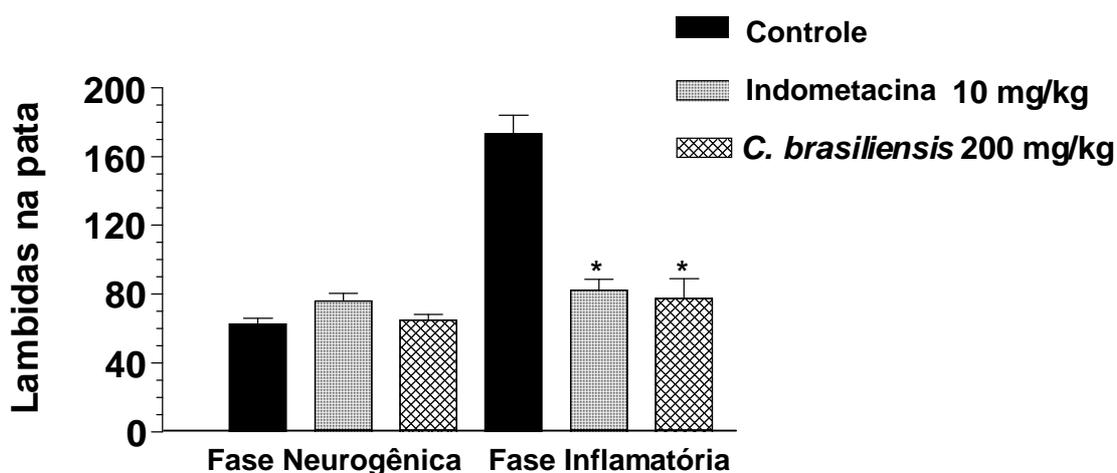


Figura 52: Efeito da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis* administrada oralmente no teste da formalina

No teste da formalina, em que se pode avaliar a ação de fármacos na fase neurogênica ou na fase inflamatória, a fração ácida atenuou a dor apenas na fase inflamatória. O comportamento foi semelhante ao observado com a indometacina (AINE), usado como controle positivo. Geralmente as drogas anti-inflamatórias são completamente ineficazes em inibir a primeira fase do teste de formalina (HANSAAR E HOLE, 1987; BEIRITH et al, 1998). O fato da fração ácida inibir a fase inflamatória, onde ocorre principalmente a ação de prostaglandinas, reforça a seu efeito antinociceptivo.

4.4.3. Coordenação motora (“rota-rod”)

Com o objetivo de avaliar a atividade locomotora, camundongos foram submetidos ao teste “rota-rod”. O desempenho do animal no rota-rod foi avaliada numa rotação de 10 rpm/min, durante 120 segundos. Os animais receberam salina ou fração ácida (v.o). Os animais tratados com a fração ácida foram comparados com os animais controle. O tempo de permanência dos animais controle foi de 120 segundos e dos animais tratados foi de $118,4 \pm 2,2$ s.

Este resultado mostra que o efeito antinociceptivo da mistura de ácidos de *C. brasiliensis* não pode ser atribuído a efeitos centrais não específicos, uma vez que nenhuma resposta significativa (alteração da coordenação motora do animal) foi observada no teste do “rota-rod”.

4.4.4. Teste de Toxicidade

Na avaliação para toxicidade, os animais (n=3) foram observados por um período de 14 dias após a administração oral da droga nas doses de 100 e 500mg/kg. Nesta dose foi observada a morte de 1 (um) animal.

Relacionando a toxicidade da mistura de ácidos, a DL50 foi de 5 vezes o valor da dose eficaz, o que mostra a existência de uma margem de segurança bem próxima de outros produtos naturais tais como, o extrato etanólico das cascas de *K. ivorensis* (Meliaceae), por exemplo (AGBEDAHUNS, 2004).

Embora o conjunto de resultados obtidos neste trabalho com a mistura de ácidos ciclopentênicos indique uma ação periférica, mas não central, a sua ação sobre os mediadores pró-inflamatórios deve ser melhor investigada.

Conforme foi apresentado nos itens anteriores, a mistura de ácidos não causou lesão da mucosa gástrica, diferentemente do que ocorre na administração da indometacina. A indometacina é um AINE que inibe seletivamente a COX-1 (constitutiva), provocando lesão gástrica, o que culminou na pesquisa de novos AINES mais seletivos para COX-2 (induzida), promotora do processo inflamatório (RIBEIRO et al, 2000). Embora, não se tenha condições de inferir seletividade da mistura de ácidos por COX-1 ou COX-2, pode-se sugerir que esta mistura, semelhante a várias AINES, tem atividade pelo menos em parte, por ambas as COXs, em diferentes proporções.

Os resultados apresentados mostram que a mistura de ácidos extraídos das sementes dos frutos de *C. brasiliensis* possui um significativo efeito antiinflamatório e antinociceptivo periférico que podem ter contribuído para o seu uso no alívio de alguns sintomas da doença de Hansen. Alguns desses efeitos podem estar relacionados com a capacidade dos ácidos ciclopentênicos inibirem os mediadores pro-inflamatórios, tais como, TNF- α e PGE₂. Uma possível explicação para este efeito pode estar relacionado com a ação antiinflamatória de ácidos graxos insaturados descrita por Gil (GIL, 2002). Segundo este autor, alguns lipídios extraídos de óleos vegetais possuem ação antiinflamatória graças a sua habilidade de reduzir a síntese de produtos oxigenados (mediadores da inflamação) provenientes do ácido araquidônico

pela competição por enzimas oxidativas (ciclooxigenase e lipooxigenase). Uma outra explicação estaria no efeito antagonista dos ácidos ciclopentênicos sobre os receptores de prostaglandinas (BREYER E HATA, 2004), possivelmente pela semelhança estrutural entre estes compostos e as prostaglandinas. Contudo, nada pode ser afirmado sob a ação da droga nestes receptores, pois nenhum experimento foi realizado neste sentido.

5. Conclusões

Mediante utilização das técnicas de CG e CGAR-EM em conjunto com as técnicas de RMN e IV foi possível identificar e quantificar os constituintes principais presentes na fração ácida do óleo de *C. brasiliensis*. Os ácidos ciclopentênicos hidnocárpico, chaulmúgrico e górlico são os compostos majoritários desta fração.

O estudo da estabilidade do óleo mostrou que o armazenamento desta fração sobre refrigeração retarda o processo de degradação destes compostos. Quando esta fração está sob a ação da luz e temperatura ambiente, por um longo período, produtos de oxidação, principalmente diácidos e cetonas, são formados a partir da degradação dos ácidos hidnocárpico, chaulmúgrico e górlico.

Os estudos com a mistura de ácidos de *C. brasiliensis* demonstraram que esta fração, quando administrada oralmente, possui uma atividade antiinflamatória e analgésica periférica significativas. Esses efeitos podem estar correlacionados com a capacidade desta fração em inibir a ação de prostaglandinas e outras citocinas mediadoras da inflamação e dor.

Na avaliação da toxicidade desta fração, observou-se que a janela terapêutica, embora pequena, é bastante próxima de alguns produtos naturais que apresentam a mesma atividade. Além disso, a mistura de ácidos não causou a lesão da mucosa gástrica muito observada na administração de AINEs.

A síntese das coleções de moléculas, na forma de mistura, permitiu avaliar a atividade farmacológica de várias moléculas em curto espaço de tempo. As coleções de mistura de epóxidos e álcoois apresentaram uma menor atividade antiinflamatória que os ácidos ciclopentênicos.

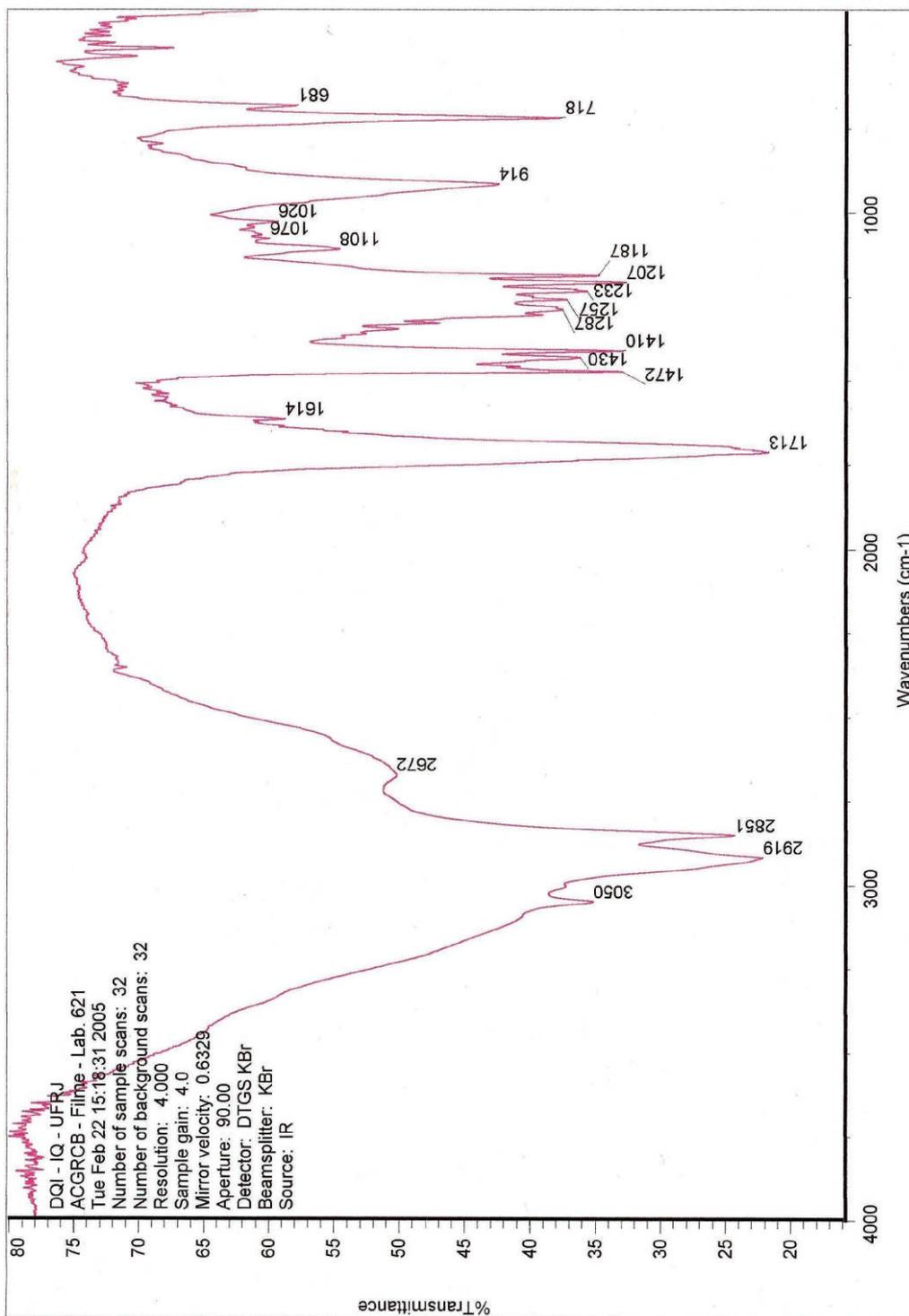
Embora as estruturas químicas dos compostos em estudo tenham semelhanças com a estrutura das prostaglandinas e apresentem alguma atividade farmacológica, a sua capacidade em inibir os mediadores da inflamação devem ser melhor investigados.

6. Perspectivas e objetivos futuros

Dentre os estudos a serem realizados futuramente, podem ser destacados:

- 1- O isolamento das substâncias majoritárias presentes no óleo, visando avaliar se estas quando isoladas, apresentam maior atividade farmacológica.
- 2- Uma abordagem mais minuciosa dos produtos de auto-oxidação deve ser considerada. O isolamento e identificação destes compostos são importantes para que seja posteriormente avaliada a sua contribuição na ação farmacológica estudada.
- 3- Criação de uma biblioteca de cetonas derivadas da mistura de *C. brasiliensis* a fim de comparar as estruturas destas moléculas com os produtos formados durante a degradação do óleo. Comparar a atividade farmacológica desta coleção de moléculas com aquelas coleções criadas neste trabalho.
- 4- Avaliar a ação da mistura de ácidos graxos em modelos de inflamação crônica.

7. Anexos



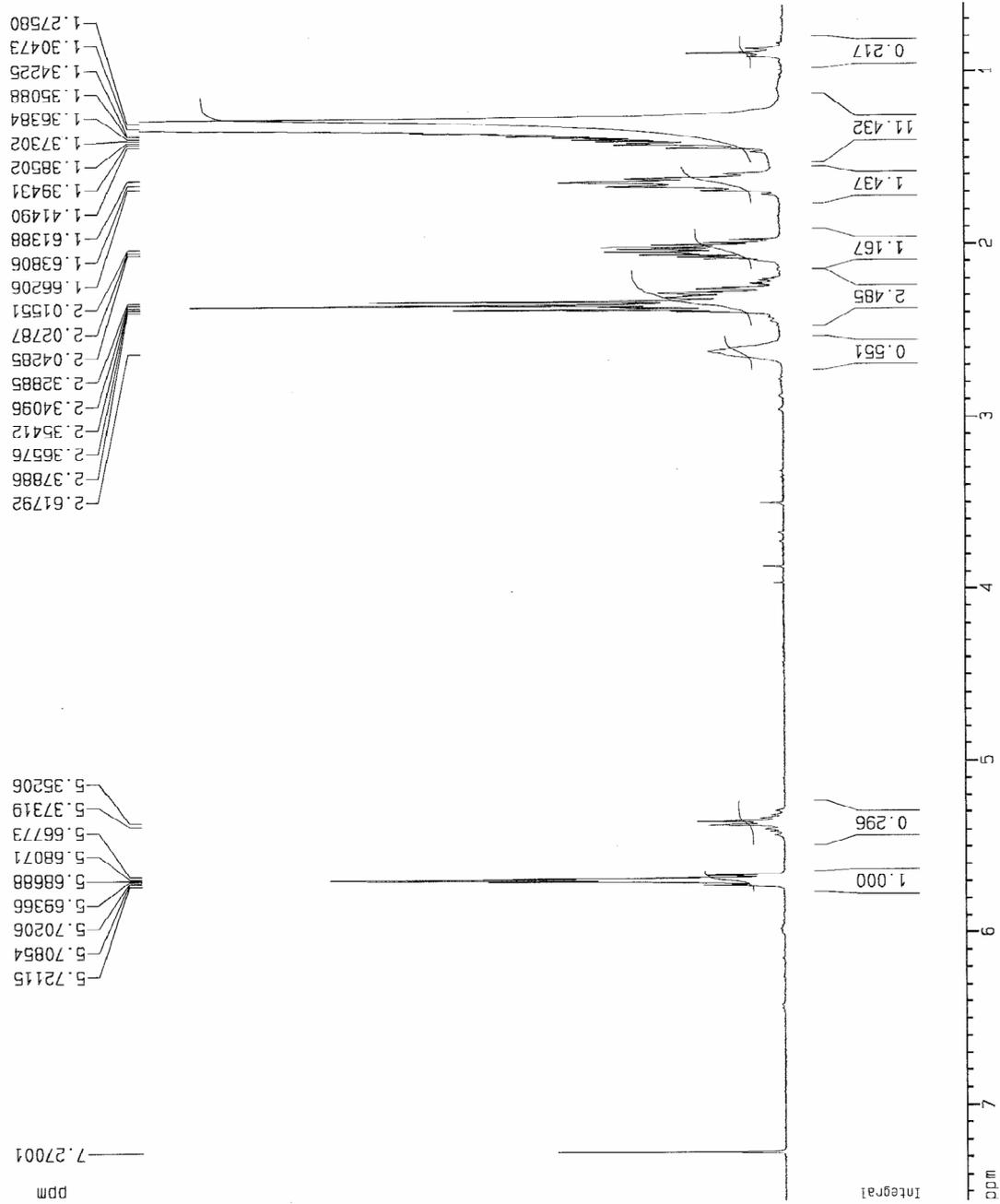
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de ácidos graxos do óleo da semente do fruto de *C. brasiliensis*

NAME Adriana
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 50000
 Time 15.26
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SMH 6188.119 Hz
 FIDRES 0.186846 Hz
 AQ 2.6477044 sec
 RG 512
 DW 80.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 10.00 usec
 DE 6.00 usec
 SFO1 300.1325511 MHz
 NUC1 1H
 PL1 3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300.1300032 MHz
 XDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1F 7.552 ppm
 F1 2266.65 Hz
 F2F 0.612 ppm
 F2 183.67 Hz
 PPMCM 0.34701 ppm/cm
 HZCM 104.14653 Hz/cm



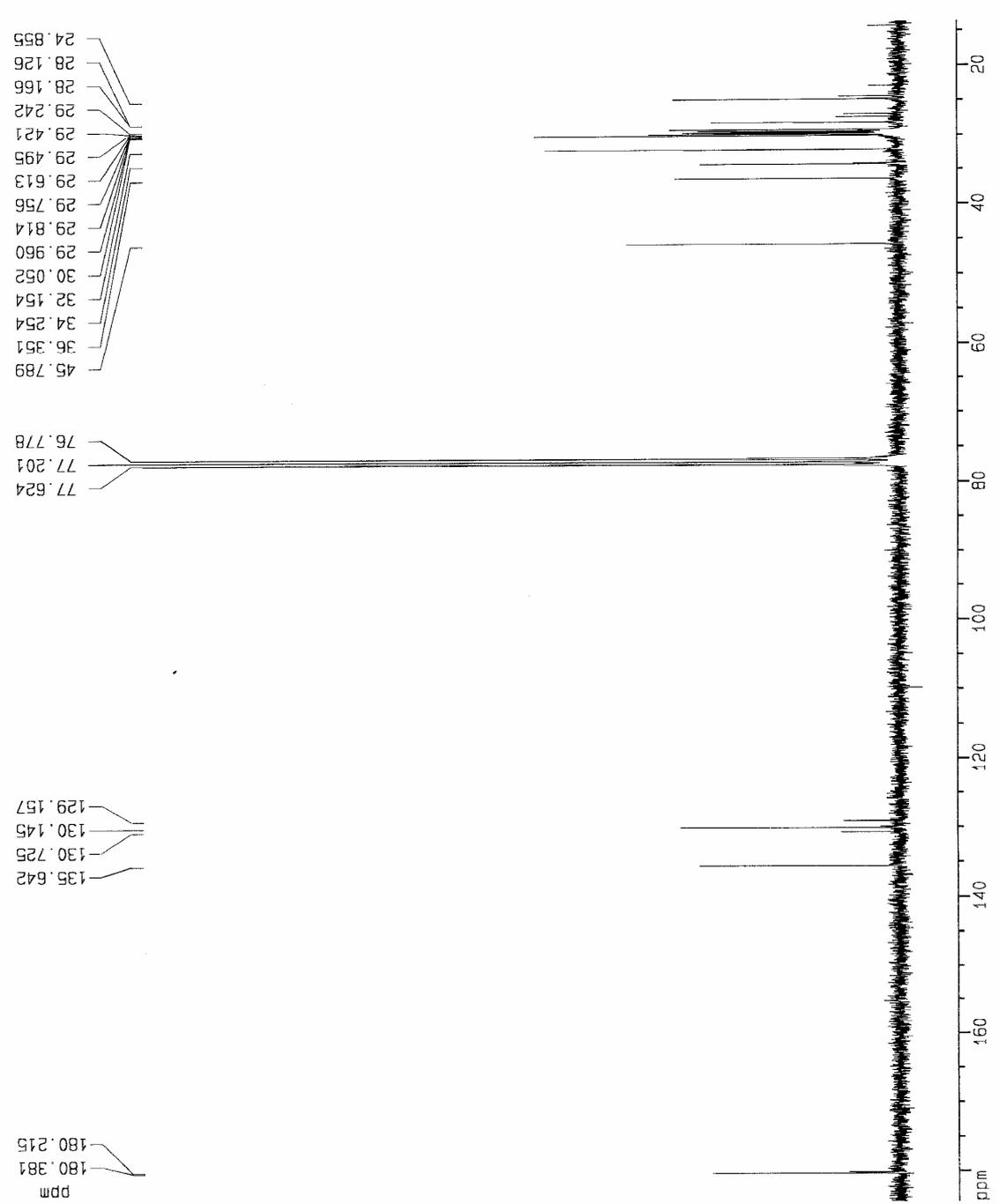
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) da mistura de ácidos graxos do óleo da semente do fruto de *C. brasiliensis*

Current Data Parameters
 NAME Adriana
 EXPNO 2
 PROCNO 1

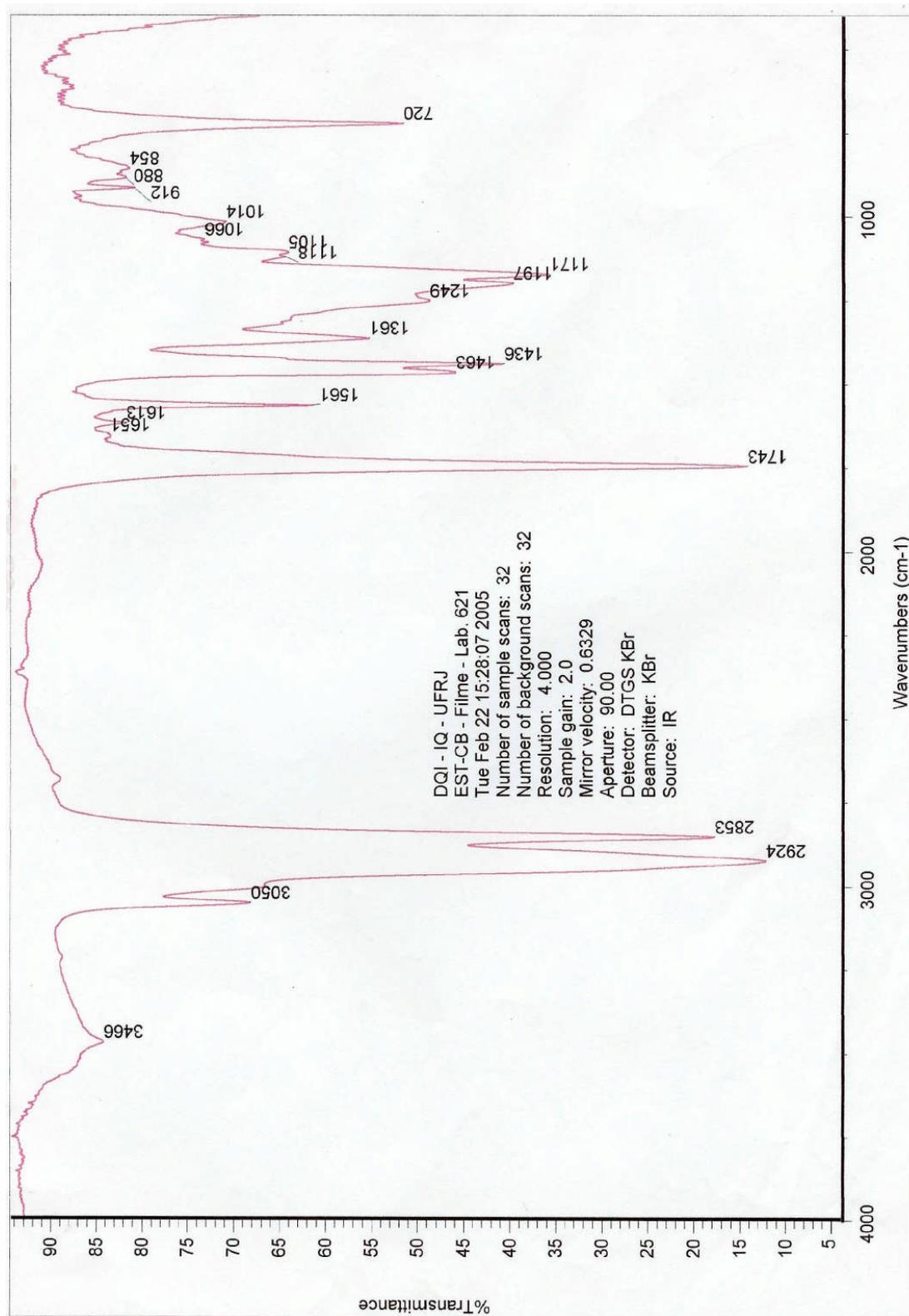
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time 16.04
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 2913
 DS 2
 SWH 19665.039 Hz
 FIDRES 0.300370 Hz
 AQ 1.654664 sec
 RG 32768
 DM 25.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D12 0.0002000 sec
 PL13 120.00 dB
 D1 1.20000005 sec
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 SF02 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 PL2 3.00 dB
 PL12 25.00 dB
 P1 9.50 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 75.4760204 MHz
 NUC1 13C
 PL1 4.00 dB
 D11 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677355 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 164.444 ppm
 F1 13919.60 Hz
 F2P 13.648 ppm
 F2 1030.01 Hz
 PPMCM 8.53980 ppm/cm
 HZCM 644.47955 Hz/cm



Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) da mistura de ácidos graxos do óleo da semente do fruto de *C. brasiliensis*



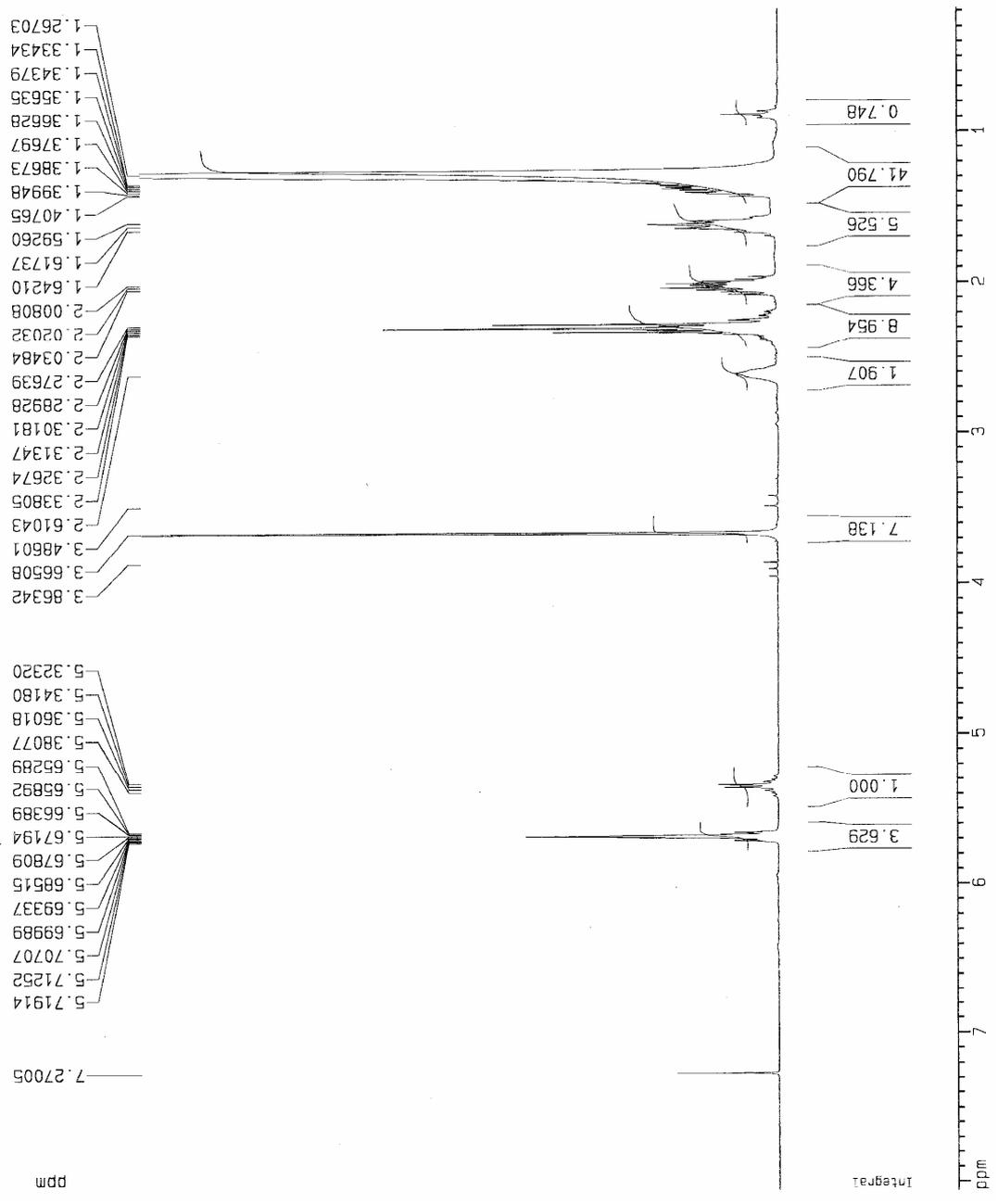
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano

Current Data Parameters
 NAME Adriana
 EXPNO 5
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time_ 12.28
 INSTRUM spect
 PROBH0 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 6188.119 Hz
 FIDRES 0.188846 Hz
 AQ 2.6477044 sec
 RG 456.1
 DW 80.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 P1 10.00 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 300.1325511 MHz
 NUC1 1H
 PL1 3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 15384
 SF 300.1300032 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.059 ppm
 F1 2418.69 Hz
 F2P 0.181 ppm
 F2 54.44 Hz
 PPMCM 0.35387 ppm/cm
 HZCM 118.21284 Hz/cm



Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano

Current Data Parameters
 NAME Adriana
 EXPNO 6
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time 13.36
 INSTRUM spect
 PROCNO 5 mm Multinucl

PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 1438
 DS 2

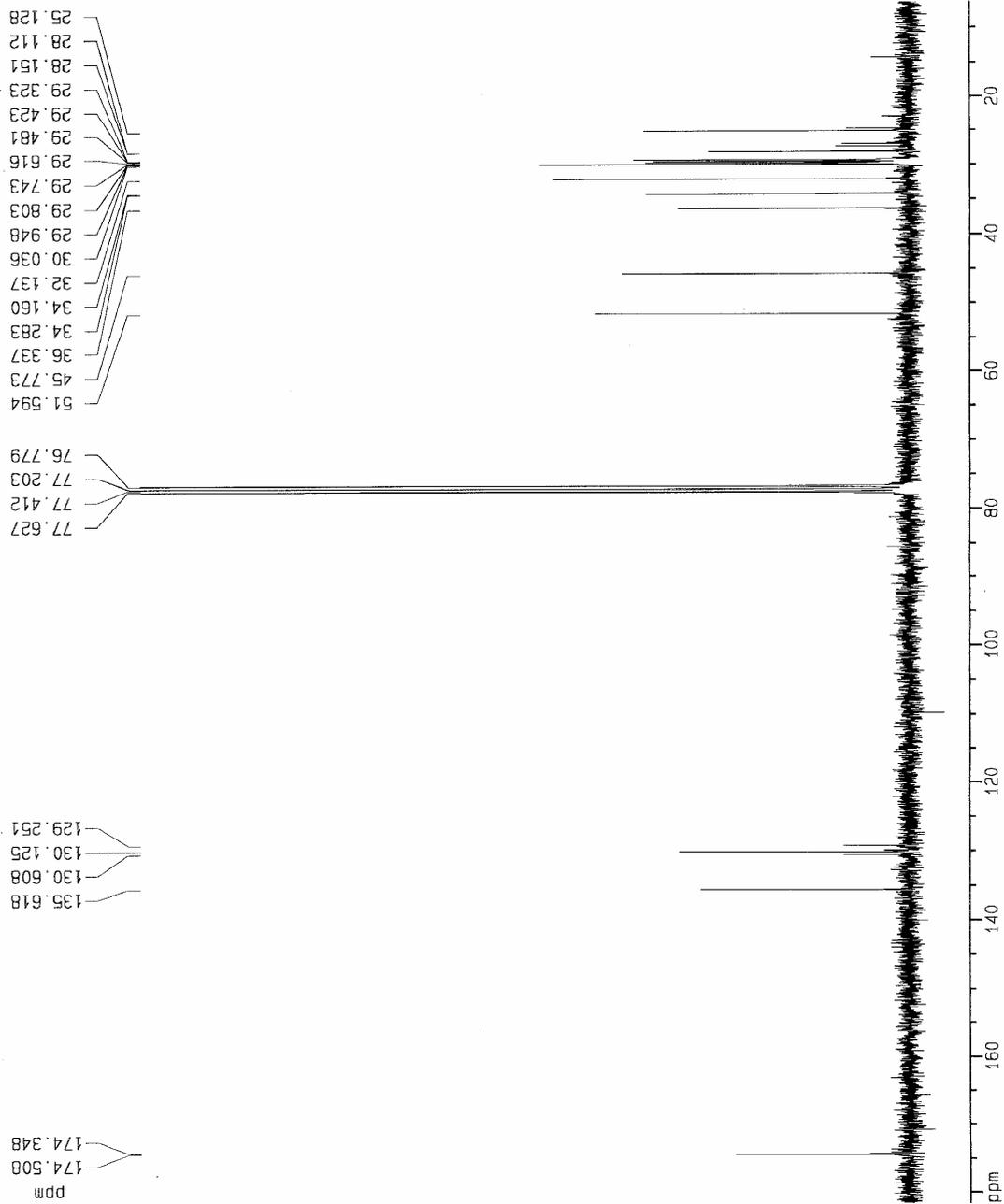
SWH 19665.039 Hz
 FIDRES 0.300370 Hz
 AQ 1.16646644 sec
 RG 32788
 DW 25.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K

D12 0.0002000 sec
 PL13 120.00 dB
 D1 1.20000005 sec

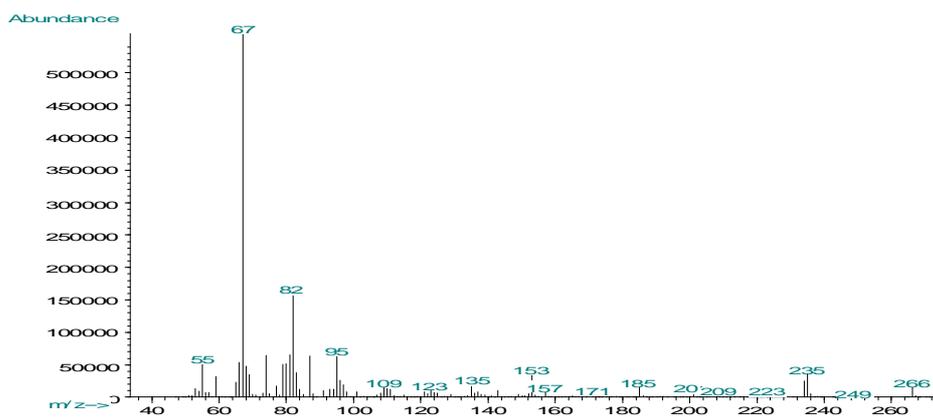
CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 SF02 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 PL2 3.00 dB
 PL12 25.00 dB
 P1 9.50 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 75.4760204 MHz
 NUC1 13C
 PL1 4.00 dB
 D11 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677361 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

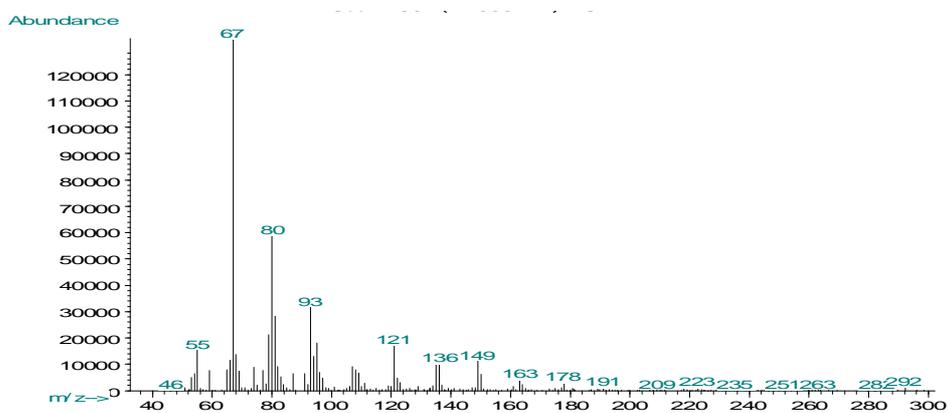
1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 161.562 ppm
 F1 13701.35 Hz
 F2P 6.270 ppm
 F2 473.20 Hz
 RPWCM 8.76411 ppm/cm
 HZCM 661.40765 Hz/cm



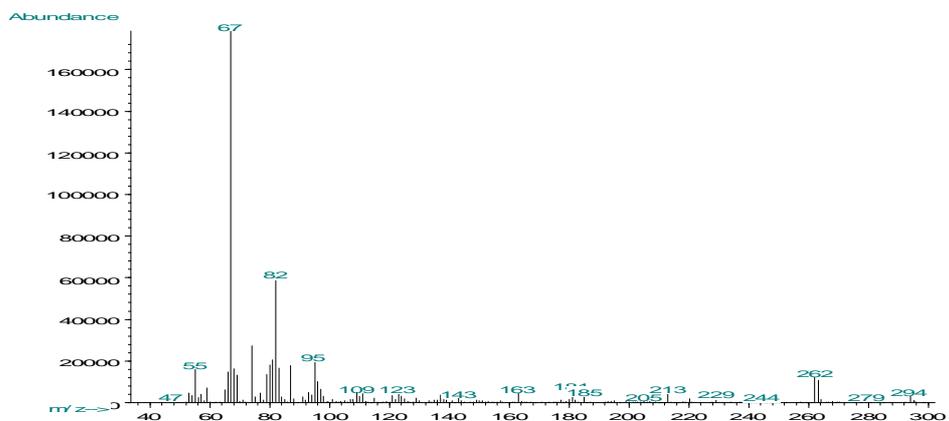
Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano



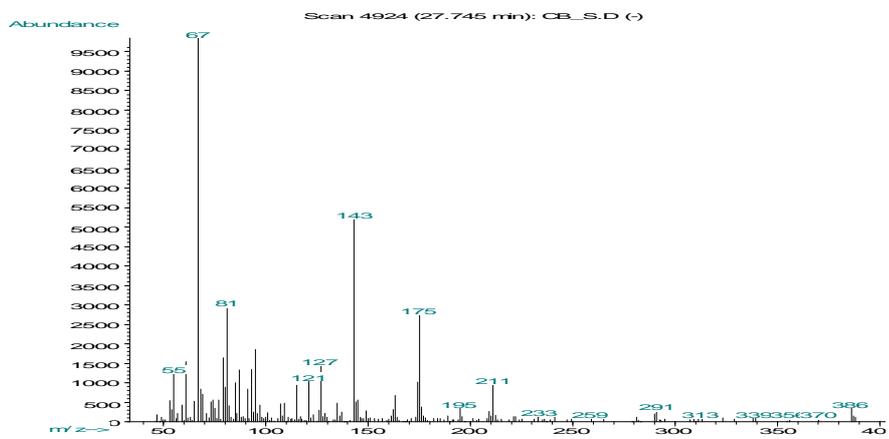
Espectro de massas do éster metílico do ácido chaulmúgrico



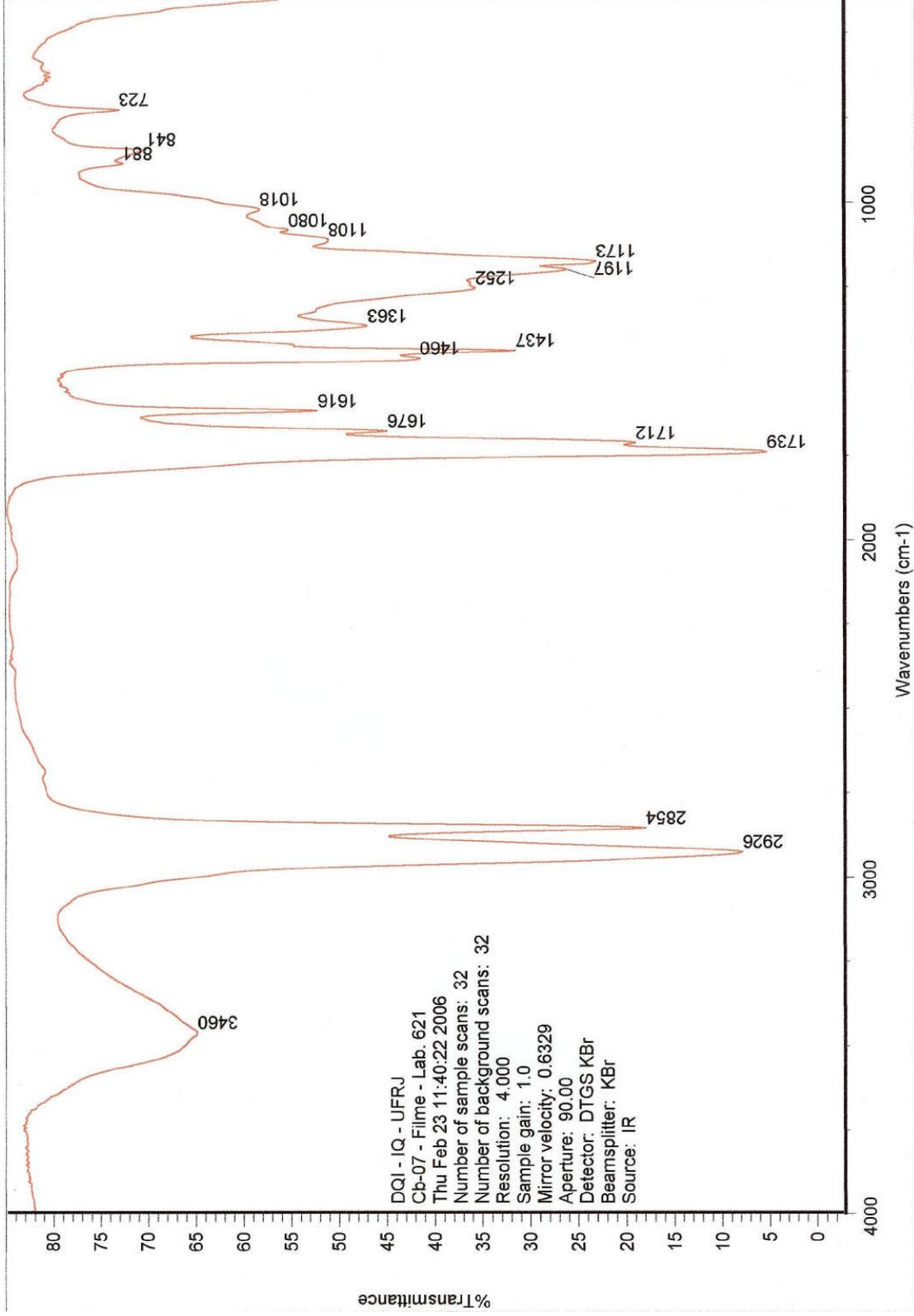
Espectro de massas do éster metílico do ácido górgico



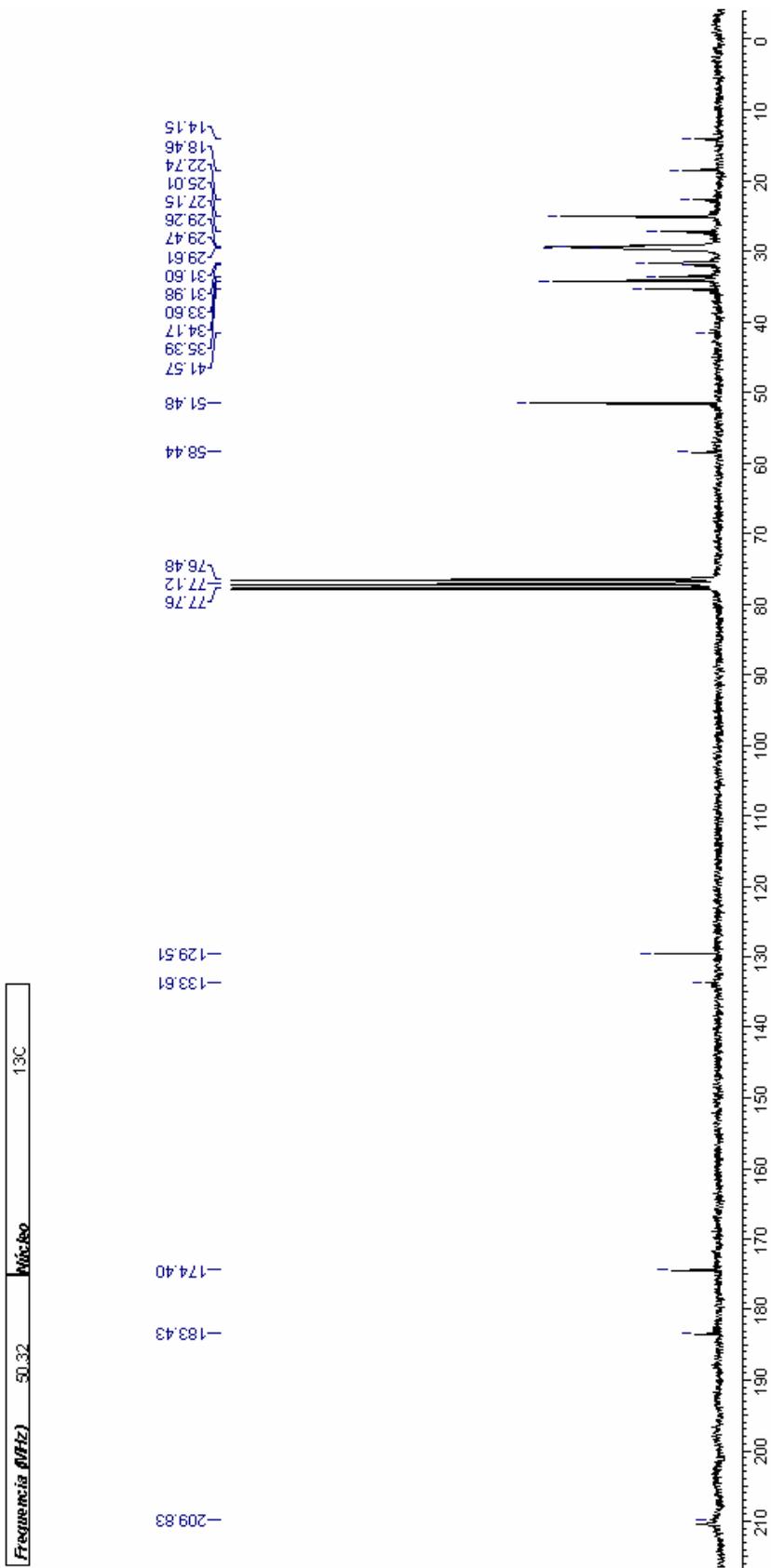
Espectro de massas do éster metílico do ácido hidnocárpico



Espectro de massas do derivado metilolado do gorlato de metila

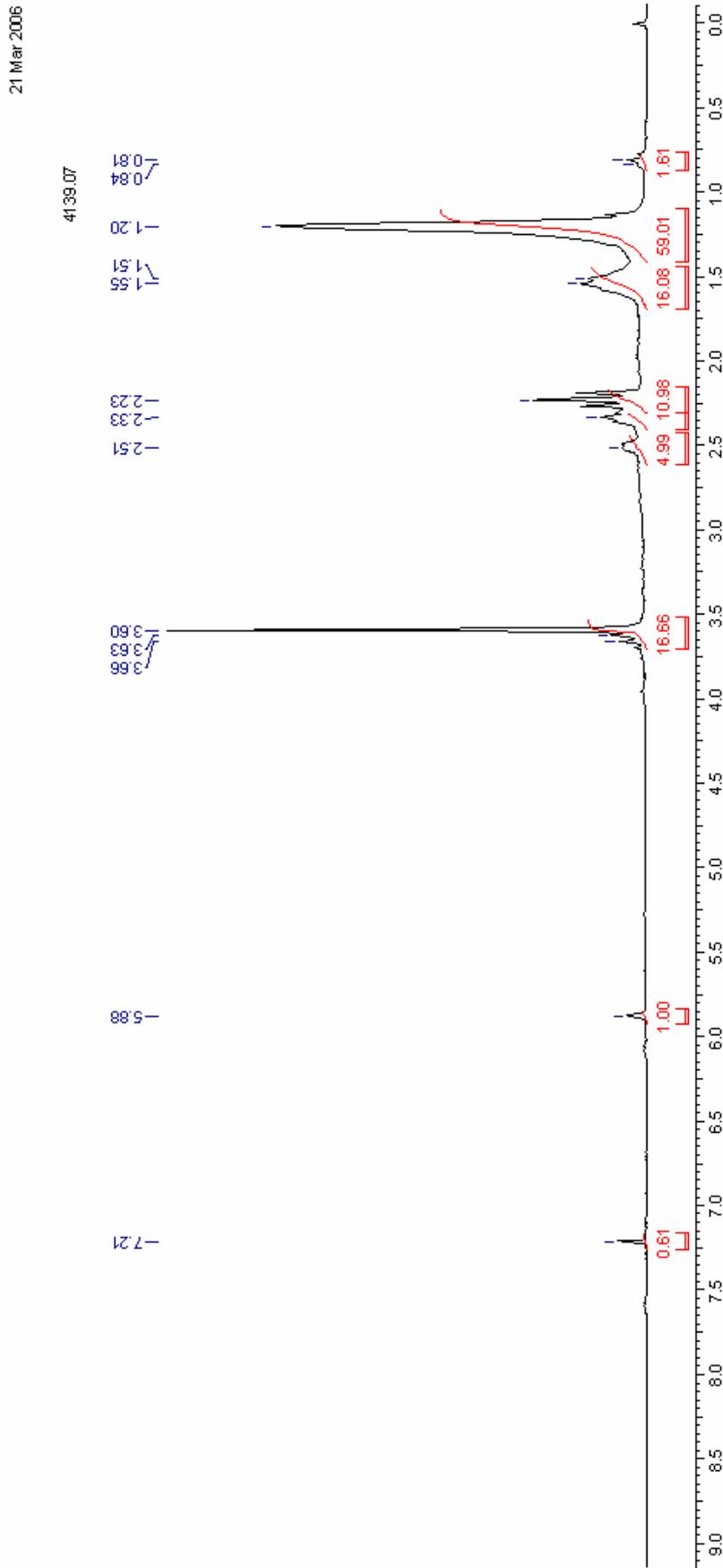


21 Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano (amostra 6)

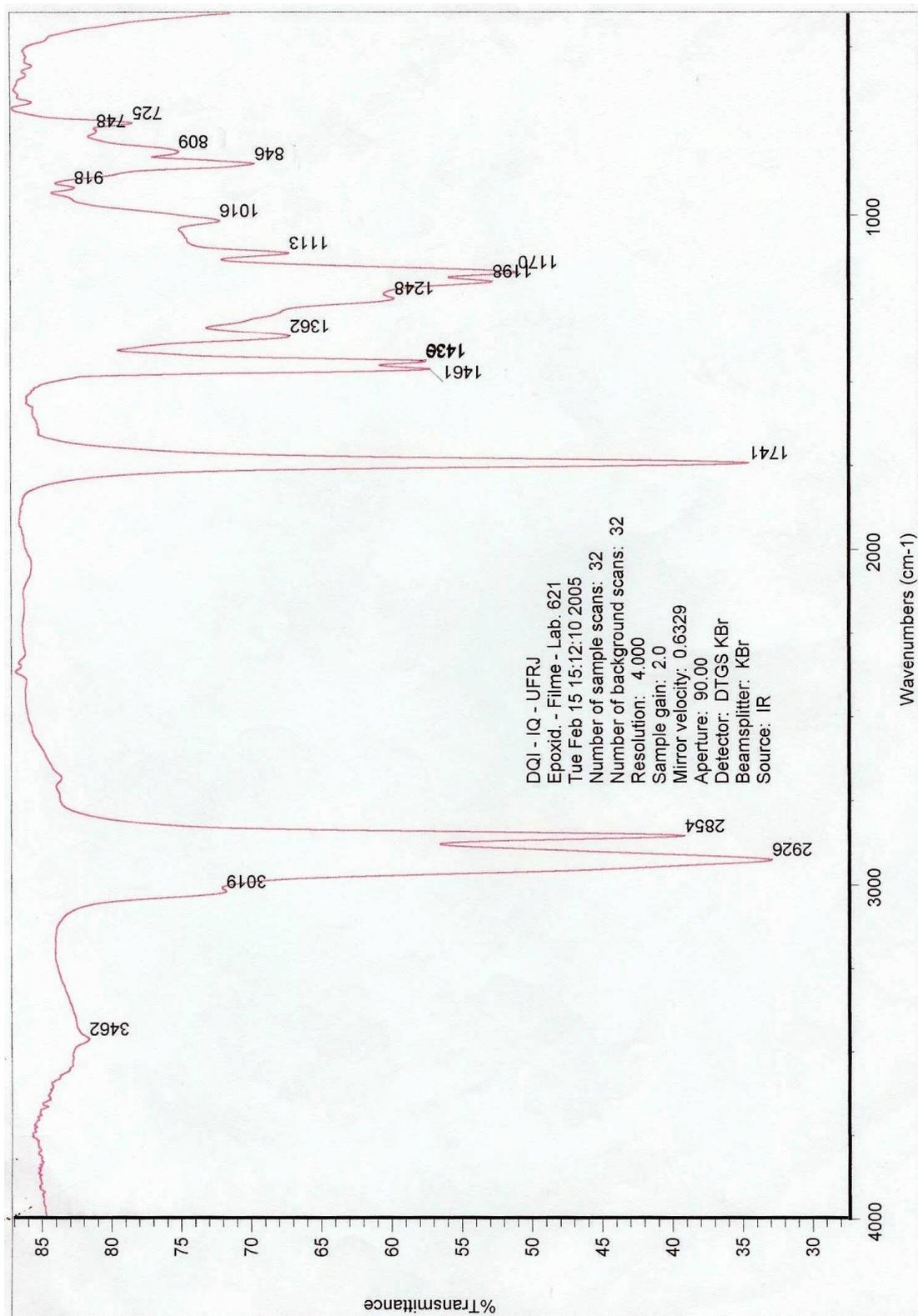


Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano (amostra 6)

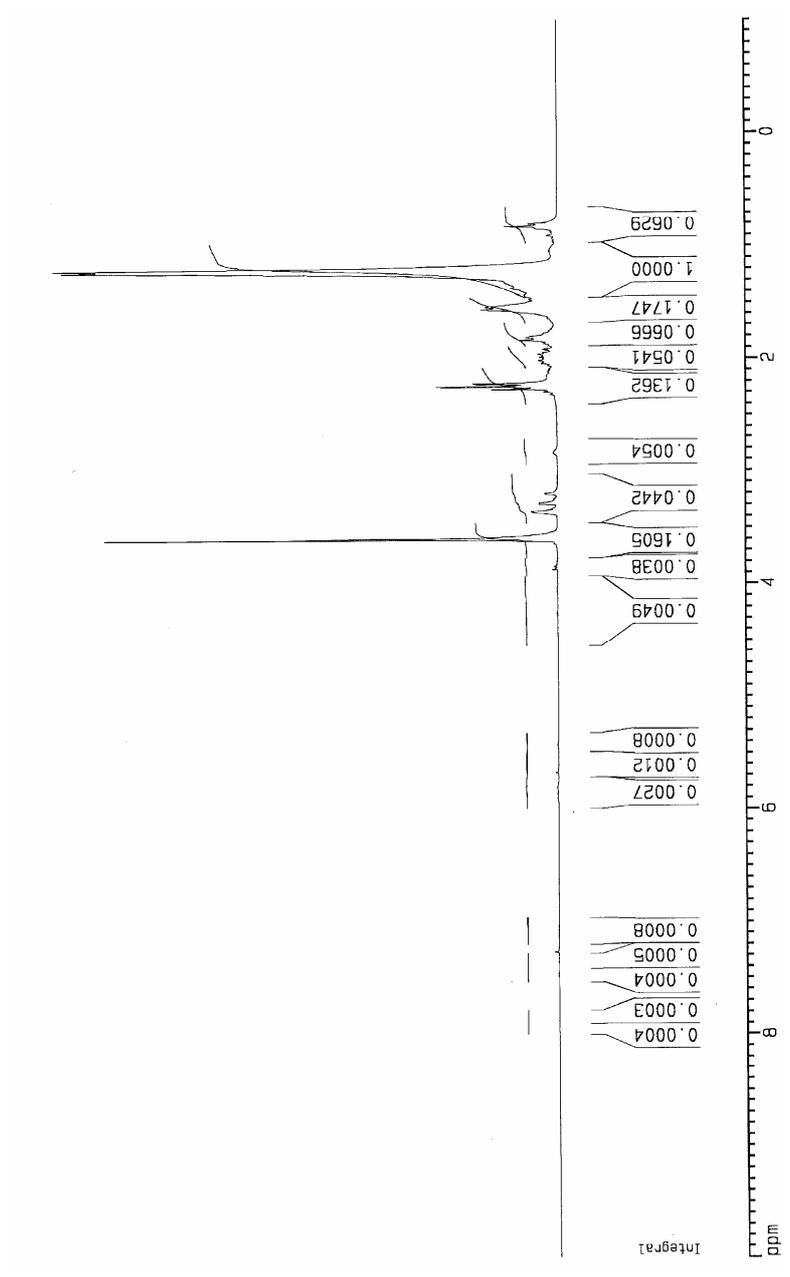
Frequencia (MHz) 200.13 Núcleo 1H



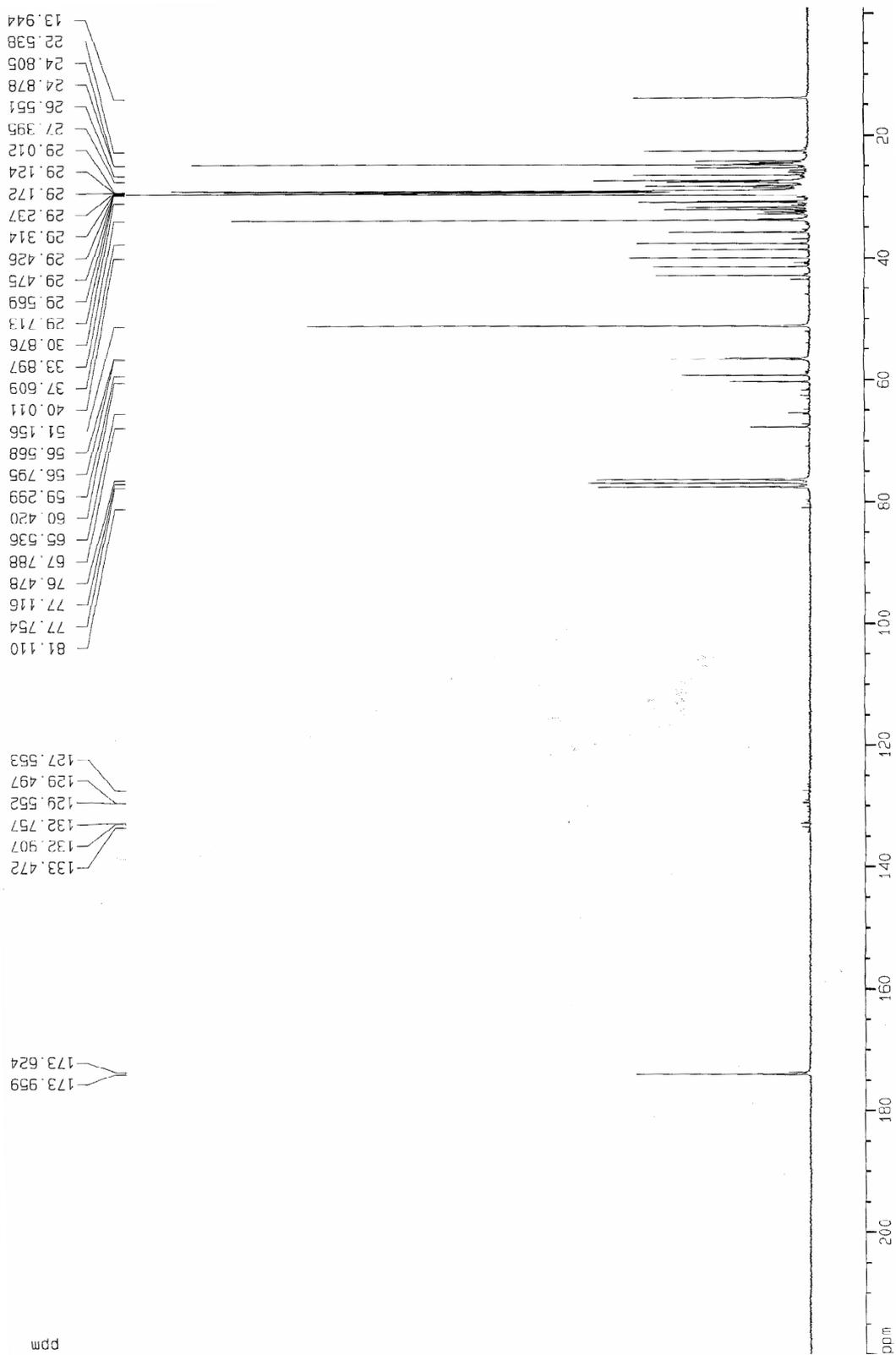
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) da mistura de ésteres metílicos obtidos após a derivatização da mistura degradada de ácidos do óleo da semente de *C. brasiliensis* com solução de diazometano (amostra 6)



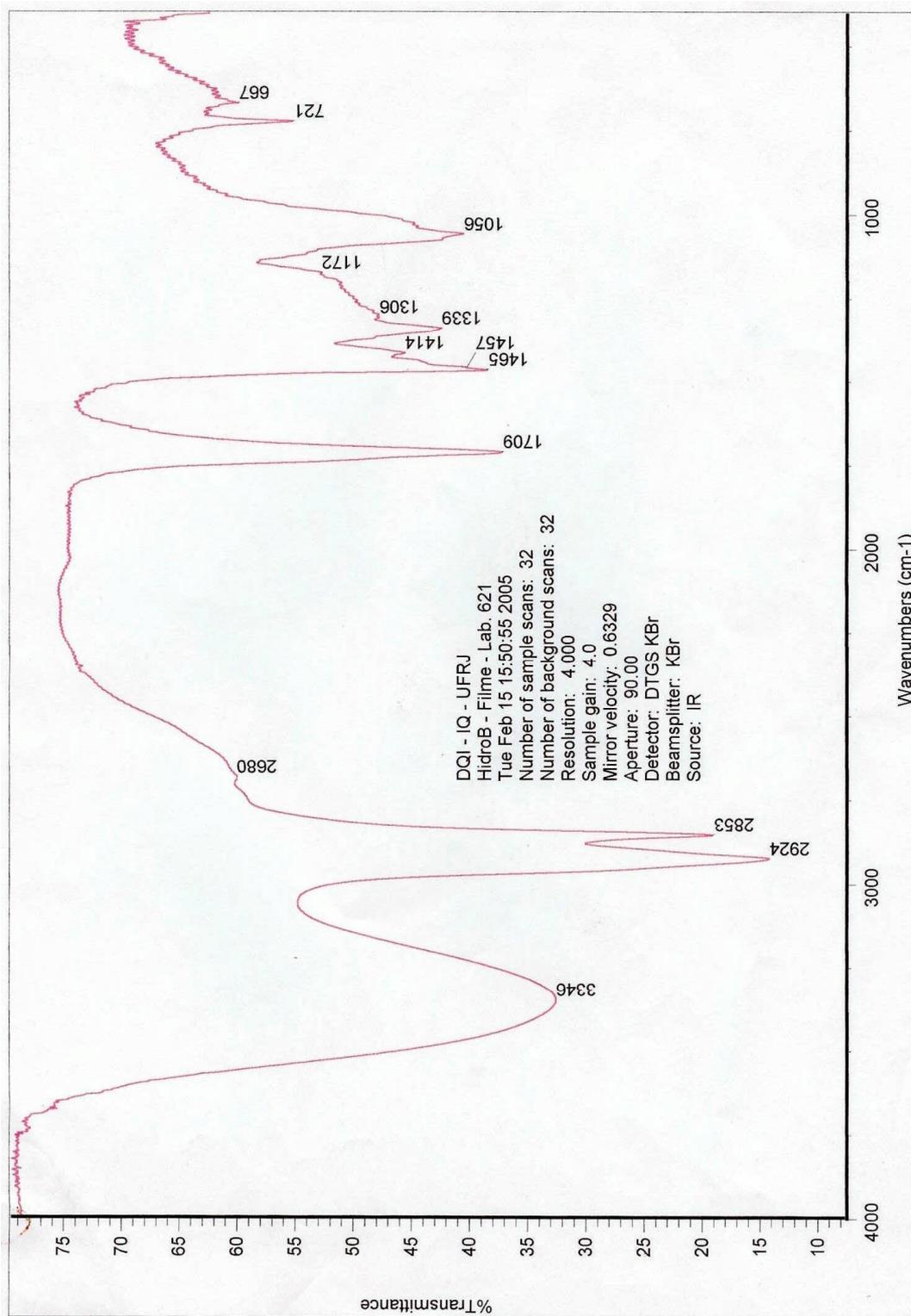
Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*



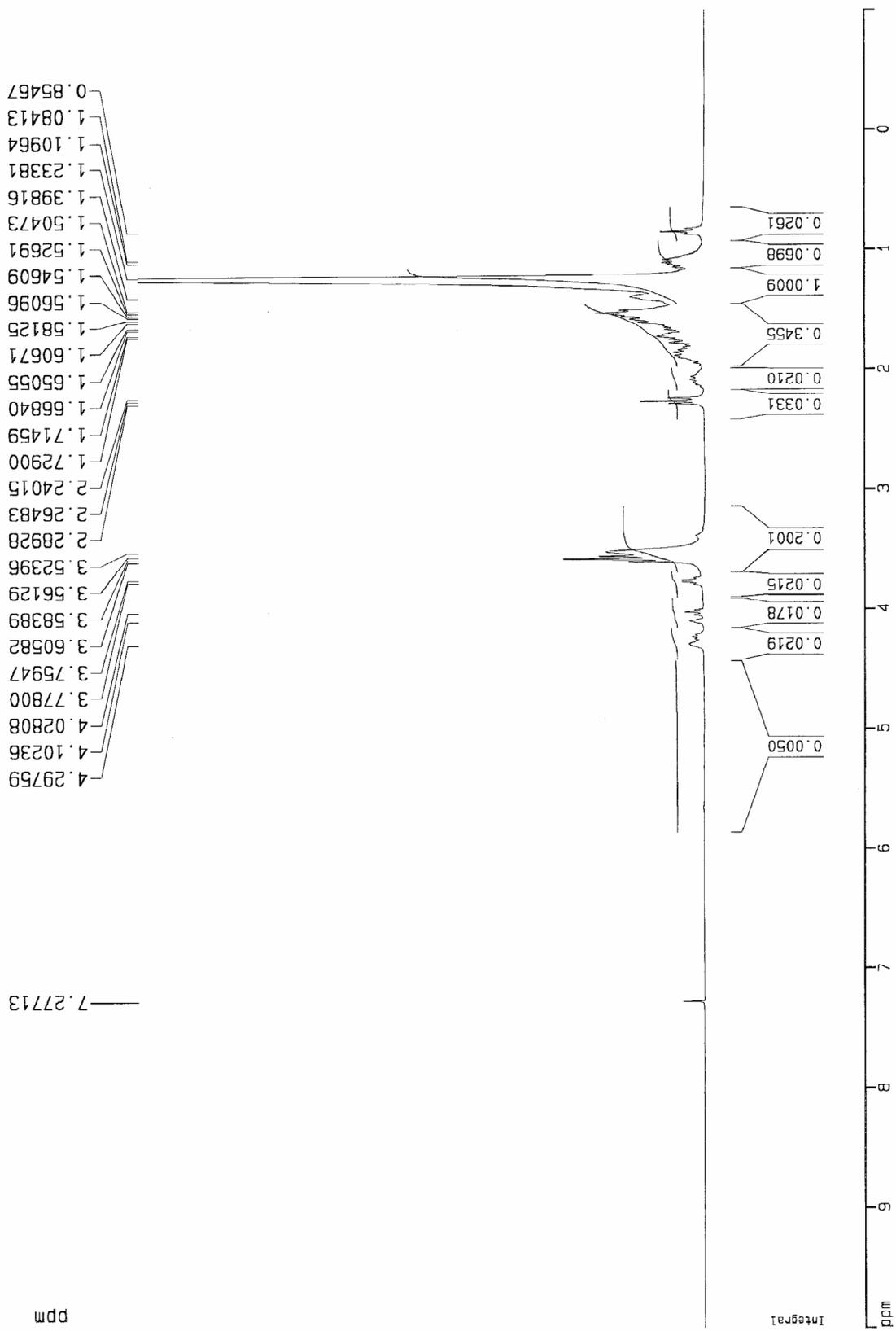
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) da mistura de epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*



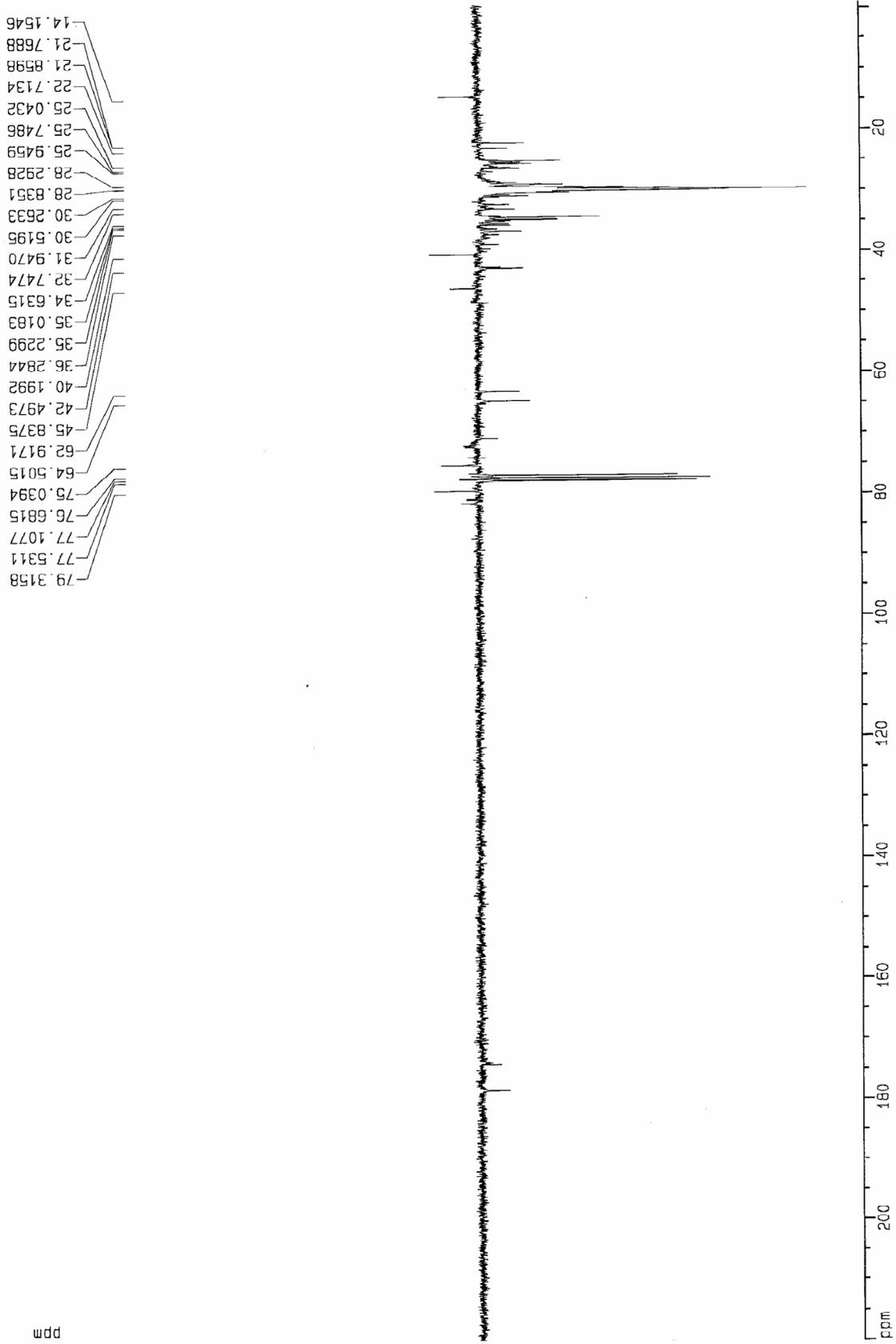
Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) da mistura de epóxidos dos ésteres metílicos derivados da fração ácida do óleo da semente de *C. brasiliensis*



Espectro de IV (filme em KBr) da mistura de álcoois obtida a partir da hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*



Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) da mistura de álcoois obtida a partir da hidrólise da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*



Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da mistura de álcoois obtida a partir da hidroboração da mistura de ácidos graxos do óleo da semente de *C. brasiliensis*(DEPT)

8. Referências Bibliográficas

ABDEL-MOETY, V. E. M. Cyclopentenylfettsauren als Ausgangsmaterial zur Gewinnung neuer Wirkstoffe. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **1981**, 2, 65-70.

ABREU, P. M.; BRANCO, P. S. Natural Product-Like Combinatorial Libraries. *Journal of the Brazilian Chemical Society.*, **2003**, 14, 675-712.

ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; HWANG, D.H.; KRAHENBUHL, J. L. Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E₂ production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. *Infection and Immunity*, **1997**, 65, 1152-57.

ANDRÉ, E.; JOUATTE, D. *Bulletin de la Société Chimique*. **1928**, 43, 347 *apud* COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Isolation and properties of gorlic acid, an optically active liquid fatty acid. *Journal of the American Chemical Society*, **1938**, 60, 612-614.

ARAÚJO, H. C. S. *História da Lepra no Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, **1946**.

ARAÚJO, M. G. 1925 - 2005 Evolution and current status of leprosy chemotherapy. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **2005**, 80, 199-202.

ATUEGBU, A.; MACLEAN, D.; NGUYEN, C.; GORDON, E. M.; JACOBS, J. W. Combinatorial Modification of Natural Products: Preparation of Unencoded and Encoded Libraries of Rauwolfia Alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1996**, 4, 1097-1106.

BABA, S. M.; BALARISHAN, V. K.; MATHUR, H. H. ; BHAT-TACHARYA, S. C.

Macrocyclic Musk Compunds. Part XV: Synthesis of Macrocyclic Lactones and Related Compounds from Hydnocarpic and Chaulmoogric acids. *Indian Journal of Chemistry*, **1966**, 4, 229-234.

BARREIRO, E. J.; GOMES, L. N. L. F., Síntese de Prostaglandinas a partir de produto Natural Abundante, *Anais da Associação Brasileira de Química*, **1982**, 33, 115-117.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A. L. S.; Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, **1998**, 345, 233-245.

BLAISE, P; FARINES, M.; SOULIER, J. Identification of cyclopentenyl fatty acids by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1997**, 6, 74.

BOKIL, W. V.; NARGUND, K. S. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, **1941**, 13A, 233. *apud* LOPES, L. N., Síntese de Prostaglandinas Modificadas a partir do ácido Hidnocárpico. *Dissertação de Mestrado, NPPN-UFRJ*, Rio de Janeiro, **1982**.

BRODY, S. N. *The Disease of the Soul: Leprosy in Medieval Literature*. Ithaca, New York: Cornell University Press, **1974**.

BROWN, H. C.; GARG, C.P., Organoboranes for synthesis, *Tetrahedron*, **1986**, 42, 5511-14.

BUNIN, B. A.; ELLMAN, J. A.; A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, 10997-10998.

BURSCHKIES, K. Cinnamic esters and their significance for the chemotherapy of leprosy and tuberculosis. *Naturwissenschaften*, **1943**, 31, 369-373.

BUSER, H. R.; Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts, *Analytical Chemistry*, **1983**, 55, 818-822.

CARMICHAEL, A. G. *The Cambridge World History of Human Disease*. Kiple, K. F., ed. Cambridge University Press, **1993**.

CHAMPMAN, O. L.; MATTES, K. C.; SHERIDAN, R. S.; KLUN, J. A. Stereochemical Evidence of Dual Chemoreceptors for an Achiral Sex Pheromone in Lepidoptera., *Journal of the American Chemical Society*, **1978**, 100, 4878-4884.

CHAN C. C.; BOICE, S.; BRIDEAU C. Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: A novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1995**, 274, 1531-1537.

CHEN, S. Q.; JANDA, K. D.; Synthesis of Prostaglandin E2 Methyl Ester on a Soluble-Polymer Support for the Construction of Prostanoid Libraries., *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 8724-8725.

COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Isolation and properties of gorgic acid, an optically active liquid fatty acid. *Journal of the American Chemical Society*, **1938a**, 60, 612-614.

COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Analysis of Chaulmoogra Oils. I. *Carpotroche brasiliensis* (Sapucainha) oil. *Journal of the American Chemical Society*. **1938b**, 60, 614-617.

COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Analysis of Chaulmoogra Oils. II. *Oncoba echinata* (Gorli) oil. *Journal of the American Chemical Society*. **1938c**, 60, 617-619.

COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Alepric, Alepylic, Aleprestic and Aleprolic Acids, New Homologs of Chaulmoogric Acid. *Journal of the American Chemical Society*. **1939**, 61, 2349-2353.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional vol. II, **1984**.

COVEY, H. C. People with Leprosy (Hansen's disease) during the Middle Ages. *The Social Science Journal*, **2001**, 38, 315-321.

DA SILVA, R. A. D. Medicinal Plants of Brazil. Botanical, Pharmacognostic and Chemical Study. Sapucainha. *Revista Brasileira de Medicina e Farmácia*, **1926**, 2, 627-646.

DIAS, R. L. A; CORRÊA, A. G. Aplicações de Química Combinatória no Desenvolvimento de Fármacos. *Química Nova*, **2001**, 24, 236-242.

DIASPER, D. G. M.; SMITH, J. C. *The Biochemical Journal*, **1948**, 42, 581 *apud* LOPES, L. N., Síntese de Prostaglandinas Modificadas a partir do ácido Hidnocárpico., *Dissertação de Mestrado NPPN-UFRJ*, Rio de Janeiro, **1982**.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; BENZONI, J; PETERFALVI, M. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, **1976**, 224, 30-42.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins-E and prostaglandins-F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* , **1980**, 61, 17-24.

EDDY, N. B.; TOUCHBERRY, C. F.; LIEBERMAN, J. E.: Synthetic analgesics. I. Methadone isomers and derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1950**, 98, 2, 121-137.

ESPINOLA, A. *Química Analítica. Tendência à Microescala e a análise em pequenos domínios*. 1 ed. Rio de Janeiro: Setor Científico e Cultural – Instituto de Química –Universidade Federal do Rio de Janeiro, **2004**, 149.

ESTRADA, N. M.; GARRIDO, F. M. S.; MEDEIROS, M. E.; MACHADO, S. P. Química Combinatória de Materiais com análise por Microdifração de Raio X. Primeira Parte: Fundamentos. *Química Nova*, **2005**, 28, 670-677.

FECIK, R. A.; FRANK, K. E.; GENTRY, E.J.; MITSCHER, L.A; SHIBATA, M. Use of combinatorial and multiple parallel synthesis methodologies for the development of anti-infective natural products, *International Union of Pure and Applied Chemistry*., **1999**, 71, 559-564.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine e Pharmacotherapy*, **2002**, 56, 388-396.

GILG, E. Die Natürlichen Pflanzfamilien; W.Engelmann *Leipzig*, 1925, 21;. 277-457 *apud* SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Cyanogenic Glycosides and the Systematics of the Flacourtiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **1985**, 13, 421-431.

GOMES, L. N. L. F.; BARREIRO, E. J.; Prostaglandin Analogues. Synthesis of Tetrahomoprostaglandin Derivatives from Hidnocarpic Acid isolated from Sapucainha Oil, *Journal Of Chemical Research*, **1983**, 5, 312-313.

GOODMAN, A. G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 10 edição McGraw-Hill Interamericana do Brasil, **2003**.

GUNSTONE, F. D., The study of natural epoxy oils and epoxidised vegetable oils by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1993**, 70, 1139-1144.

GRECHKIN, A. N.; CHECHETKIN, I. R.; MUKHTAROVA, L. S.; HAMBERG, M. Role of structure and pH in cyclization of allene oxide fatty acids: Implications for the reaction mechanism. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2002**, 120, 87-89.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E., E GILMAN, A. G. Goodman and Gilman's the *pharmacological basis of therapeutics*, New York: Mc Graw Hill, **2001**.

HATA, A. N.; BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in Inflammation an immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics*, **2004**, 103, 147-166.

Hunskar, S., Berge, O.-G., Hole, K., Dissociation betweenstimulus, studied the analgesic effect of diflunisal in antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid control and arthritic rats. Analgesic effect of diflunisal was and indomethacin in the formalin test. *Pain*, **1986**, 25, 125–132

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, **1987**, 30, 103-114.

HUTCHINSON, J. *The Genera of Flowering Plants*, vol 2, Clarendon Press, Oxiford, **1967**.

INTERNET: Retirado do site: www.tomdaservas.com.br/sapucaia.html em 01/12/2005.

JACOBSEN, P. L.; HERMAN N. G.; LEVY, L. The Suscetibility of Mycobacteria to Hidnocarpic Acid. *The American review of respiratory disease*, **1973**, 107, 1022-1029.

JAROSZEWSKI, J. W.; OLAFSDOTTIR, E. S. Monohydroxylated Cyclopentenone Cyanohydrin Glucosides of Flacourtiaceae. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 3348-3349.

JUNIOR, J. A.; DIAS, R. L. A.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; CORRÊA, A. G. Preparation and Evaluation of Coumarin Library towards the inhibitory Activity of Enzyme gGAPDH from Trypanosoma cruzi . *Journal of The Brazilian Chemical Society*, **2005**, 16, 763-773.

LEMKE, D. E. *Systematic Botany*, **1983**, 8, 430-435 *apud* SEIGLER, D. S.; SPENCER, K. C. Corrected Structures of Passicoriacin, Epitetraphyllin B and Their Distribution in the Flacourtiaceae and Passifloraceae *Phytochemistry*, **1989**, 28, 931-932.

LEVY, L. The activity of Chaulmoogra Acids against Mycobacterium leprae, *The American review of respiratory disease*, **1975**, 111, 703-705.

LIMA, J. A.; OLIVEIRA, A.S., MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seeds of *Carpotroche brasiliensis* (Flacourtiaceae), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2005**, 38, 1095-1103.

LOPES, L. N., Síntese de Prostaglandinas Modificadas a partir do ácido Hidnocárpico. *Dissertação de mestrado*, UFRJ-NPPN, Rio de Janeiro, **1982**.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol.1, São Paulo: Nova Odessa, **2002**.

MACHADO, *Anais da Sociedade de Medicina*, **1926**, 40, 189 *apud* COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Analysis of Chaulmoogra Oils. I. *Carpotroche brasiliensis* (Sapucainha) oil. *Journal of the American Chemical Society*, **1938b**, 60, 614-617.

MALKAR, N. B.; VAIDYA, A. A.; KUMAR, V. G. Synthesis of Dimer and Oligomers from (R)- Methyl Hydnocarpate, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2000**, 10, 1101-1105.

MESEGUER, B.; ALONSO-DIAZ, D.; GRIEBENOW, N.; HERGET, T.; WALDMANN, H.; Natural Product Synthesis on Polymeric Supports-Synthesis and Biological Evaluation of an Indolactam Library. *Angewandte Chemie*, **1999**, 38, 2902-2906.

MISLOW, K.; STEINBERG, I. V. The Synthesis and Stereochemistry of Chaulmoogric Acid. *Journal of the American Chemical Society*, **1955**, 77, 3807-3810.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos baseado em Produtos Naturais. *Química Nova*, **2001**, 24, 105-111.

MOUAT, F. J. *Amer. J. Med. Sci.*, **1854**, 30, 493 *apud* ABDEL-MOETY, V. E. M. Cyclopentenylfettsauren als Ausgangsmaterial zur Gewinnung neuer Wirkstoffe, *Fette Seifen Anstrichmittel*, **1981**, 2, 65-70.

NEGISHI, E.; AMANFU, J.; COPÉRET, C.; MILLER, J. A.; TOUR, J. M. Palladium-Catalyzed Cyclization of 1-Iodo-Substituted 1,4-, 1,5-, and 1,6-Dienes as Well as of 5-Iodo-1,5-dienes in the Presence of Carbon Monoxide, *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, 118, 5919-5931.

NICOLAOU, K. C.; DAI, W. M.; GUY, R. K. Chemistry and Biology of Taxol *Angewandte Chemie*, **1993**, 33, 15- 44.

NICOLAOU, K. C.; THEODORAKIS, E. A.; CLAIBORNE, C. F. Chemistry and biology of selected natural products, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **1996**, 68, 2129-2136.

NICOLAOU, K. C.; VOURLOUMIS, D.; LI, T.; PASTOR, J.; WINSSINGER, N.; HE, Y.; NINKOVIC, S.; SARABIA, F.; VALLBERG, H.; ROSCHANGAR, F.; KING, N. P.; FINLAY, M. R. V.; GIANNAKAKOU, P.; VERDIER-PINARD, P.; HAMEL, E. ;Designed epothilones: Combinatorial synthesis, tubulin assembly properties, and cytotoxic action against taxol-resistant tumor cells. *Angewandte Chemie*, **1997**, 36, 2097-2103.

NICOLAOU, K. C; WISSINGER, N; VOURLOUMIS, D; OHSHIMA, T.; KIM, S.; PFEFFERKORN, J.; XU, Y. J.; LI, T.; Solid and Solution Phase Synthesis and Biological Evaluation of Combinatorial Sarcodictyin Libraries *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, 120, 10814-10818.

NIELSEN, J.; LYGSON, L.O. Combinatorial solid-phase synthesis of balanol analogues, *Tetrahedron letters*, **1996**, 37, 8439-8442.

NIKIFORUK, A. *The fourth Horseman: A Short History of Epidemics Plagues, Famine and other Scourges*, New York: M. Evans and Company Inc., **1993**.

PAGET, H. Liquids Acids of Sapucainha Oil, *Journal of the American Chemical Society*, **1937**, 955-960.

PAULA, R. D. G. A Study of Sapucainha (*Carpotroche brasiliensis*), *Revista. Flora Medicinal*, **1936**, 3, 125-143.

PERKINS, G. A.; CRUZ, A. O. Synthesis of Compounds similar to Chaulmoogric Acid. II. dl-Chaulmoogric acid. *Journal of the American Chemical Society*, **1927**, 49, 1070-1077.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, Supl, **2002**, 25, 1, 45-61.

POSSOLO, H. *As Flacourtiáceas Antilepróticas*, São Paulo: Secretaria da Agricultura, indústria e Comércio de São Paulo, **1945**.

POURGHOLAMI, M. H., KAMALINEJAD, M; JAVADI, M; MAJZOOB, S; SAYYAAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 64, 2, 167-171.

POWER, F.B.; BARROWCLIFF, M. The constituents of the seeds of *Hydnocarpus wightiana* and of *Hydnocarpus anthelmintica*. Isolation of a homolog of Chaulmoogric Acid. *Journal of the Chemical Society.*, **1905**, 87, 884.

POWER, F. B.; BARROWCLIF, M. *Journal of the Chemical Society*, **1907**, 91, 557 *apud* ABDEL-MOETY, V. E. M. Cyclopentenylfettsauren als Ausgangsmaterial zur Gewinnung neuer Wirkstoffe, *Fette Seifen Anstrichmittel*, **1981**, 2, 65-70.

POWER, F. B.; GORNALL, F. H.; *Journal of the Chemical Society*, **1904**, 85, 838 *apud* ABDEL-MOETY, V. E. M. Cyclopentenylfettsauren als Ausgangsmaterial zur Gewinnung neuer Wirkstoffe, *Fette Seifen Anstrichmittel*, **1981**, 2, 65-70.

REHFELDT, A. G.; SCHULTE, E.; SPENER F. Occurrence and Biosynthesis of Cyclopentenyl Fatty Acids in Leaves and Chloroplasts of Flacourtiaceae. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1685-1689.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, *Quimica Nova*, **2004**, 27, 5, 771-780.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *European Journal of Pharmacology*, **2000**, 391, 97-103.

RIBEIRO I. G.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C., MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazol [1,2-a] pyridine 3-acylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, 33, 225-235.

RICHARDS, P. *The Medieval Leper and his Northern Heirs*. Cambridge: D. S. Brewer Ltd., **1977**.

SABNIS, S. D.; MATHUR, H.H.; BHATTACHARYYA, S. C.; Macrocyclic Musk Compounds. Part VIII- New Syntheses of Cyclohexadecanone & Dihydroambrettolide from Hydnocarpic Acid. *Journal of the Chemical Society*, **1965**, 4580-4581.

SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: Naturalista e Farmacêutico do Brasil Imperial. *Química. Nova*, **1998**, 21, 666-670.

SEIGLER, D. S.; SPENCER, K. C. Corrected Structures of Passicoriacin, Epitetracyllin B and Their Distribution in the Flacourtiaceae and Passifloraceae *Phytochemistry*, **1989**, 28, 931-932.

SHRINER, R. L.; ADAMS, R. The Structure of Chaulmoogric and Hydnocarpic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, **1925**, 47, 2727-39.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; *Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos*, sexta edição, editora LTC, Rio de Janeiro, **2000**.

SIMÕES. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 3 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, **2001**, 833.

SKOOG, D. *Princípios de Análise Instrumental*, 5 ed. Porto Alegre: Bookman, **2002**.

SOARES, B. G.; SOUZA, N. A.; PIRES, D. X. *Química Orgânica - Teoria e Técnicas de Preparação, Purificação e Identificação de Compostos Orgânicos*. 1. ed. RIODE JANEIRO - BRASIL: GUANABARA, **1988**, 322 .

SOUZA, A. *International. Journal of. Leprosy*, **1935**, 3, 50 *apud* COLE, H. I.; CARDOSO, H. T. Analysis of Chaulmoogra Oils. I. *Carpotroche brasiliensis* (Sapucainha) oil. *Journal of the American Chemical Society*, **1938**, 60, 614-17.

SOUZA, M.V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, **2004**, 27, 308-312.

SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Cyanogenic Glycosides and the Systematics of the Flacourtiaceae. *Biochemical systematics and ecology*, **1985**, 13, 421-431.

SPENER F.; MANGOLD, H. K. New Cyclopentenyl Fatty Acids in Flacourtiaceae. Straight-Chain Fatty Acids and Cyclic Fatty Acids in Lipids during Maturation of the seeds. *Biochemistry*, **1974**, 13, 2241-2248.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKHARAM, M.; VANI, P. V. S. N.; SEEMA CHIDA, A.; SINGH, A. K.;. Epoxidation of olefins at low temperature using m-chloroperbenzoic acid, *Synthetic Communications*, **2002**, 32, 1853-1858.

STANLEY W. M.; ADAMS, R. The Synthesis of Chaulmoogric Acid from Hydnocarpic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, **1929**, 51, 1515-1518.

TAMPLIN, M.; ALMOND, T. *Como diagnosticar e tratar a hanseníase* 1ª edição Genebra, **2000**.

THOMSEN, K; BRIMER, L. Cyanogenic Constituents in Woody Plants in Natural Lowland Rain Forest in Costa Rica Botanical, *Biological Journal of the Linnean Society*, **1997**, 124, 273-294.

VALENTINI, A.; NERY, J. A. C., SALLES, A. M.; VIEIRA, L. M. M.; SARNO, E.N. Edema na Hanseníase: Aspectos Clínicos e Terapêuticos, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, **1999**, 32, 131-138.

VINEGAR, R.; TRUAUX, J. F.; SELPH, J. L. Quantitative studies of pathways to acute carrageenan inflammation. *Federation Proceedings*, **1976**, 35, 2447-2456.

VOGEL, A. I.; TATCHELL, A. R.; FURNIS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; SMITH, P. W. G. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Edition, **1996**.

WAGNER-JAUREGG, T. *Chemie*, **1942**, 25/26, 195 *apud* ABDEL-MOETY, V. E. M. Cyclopentenylfettsauren als Ausgangsmaterial zur Gewinnung neuer Wirkstoffe. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **1981**, 2, 65-70.

WOOLFE G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1944**, 80, 300-307.

XIAO, X. Y.; PARADOOSH, Z.; NOVA, M. P., Design and Synthesis of a Taxoid Library Using Radiofrequency Encoded Combinatorial Chemistry. *Journal Of Organic Chemistry*, **1997**, 62, 6029-6033.

YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. *Plantas Mediciniais : sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, **2001**, 500.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)