

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

Ricardo Andrade Furtado

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Ricardo Andrade Furtado

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

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

Ribeirão Preto

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Furtado, Ricardo Andrade

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

171p.; 30cm.

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

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

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

## *Dedicatória*

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

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

## *Agradecimentos*

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

Aos professores do laboratório de farmacognosia, Dr. Fernando Batista da Costa e Dr<sup>a</sup> Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado, por sempre auxiliarem meu crescimento.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Resumo

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

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

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

## Abstract

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

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

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

## 1 Introdução

### 1.1 Produtos naturais na descoberta de fármacos

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

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

### 1.2 O gênero *Copaifera*

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



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

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

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

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

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

### 1.3 *Copaifera langsdorffii* Desf.

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

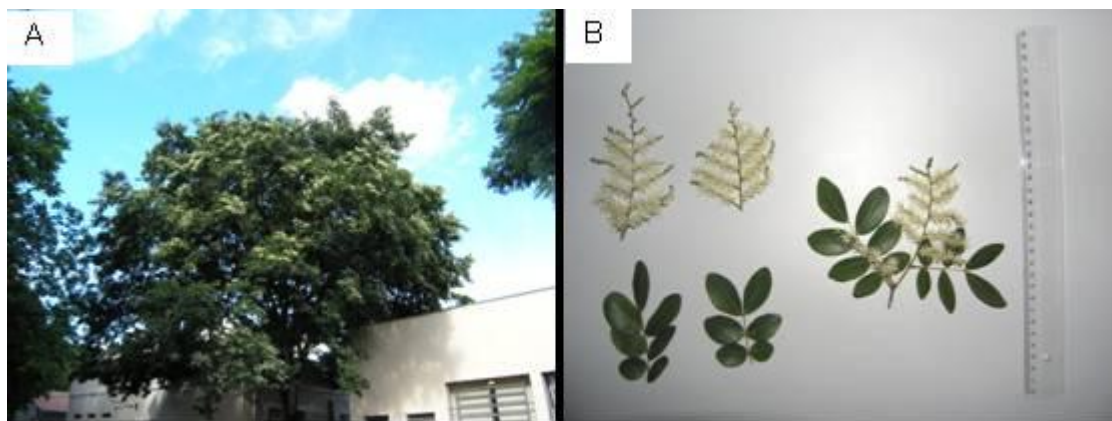


Figura 1 – A: *Copaifera langsdorffii*; B: Folhas e sementes de *C. langsdorffii*. (Souza, 2011)

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

#### 1.4 Biotransformação

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **1.5 Atividades analgésica e anti-inflamatória**

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

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

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

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

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

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

As cininas, no sítio inflamatório, são responsáveis pela permeabilidade capilar resultando na dilatação vascular e aumento de permeabilidade, ativação do Complemento, dor e aderência de neutrófilos, em consequência da ação direta sobre o endotélio da microvasculatura, ou ainda indireta, através da liberação de outras substâncias pró-inflamatórias como a síntese de citocinas. As cininas são peptídeos de 8-14 aminoácidos derivados das globulinas plasmáticas. Estes peptídeos medeiam a inflamação através da ativação constitutiva dos receptores de bradicinina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. O receptor B<sub>2</sub> é constitutivo e está presente em tecidos centrais e periféricos. Estes parecem estar implicados na maioria das ações fisiológicas das cininas. O receptor B<sub>1</sub> é geralmente ausente em tecidos normais e animais saudáveis, mas pode ser induzido e super expresso durante uma lesão tecidual ou administração de alguns mediadores inflamatórios (Antoni, 2011; Siebeck et al., 1998).

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

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

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

inflamatório deve-se principalmente à inibição da produção de prostaglandinas como a prostaglandina PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, bem como dos tromboxanos (Fitzgerald, 2003).

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

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



### Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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