



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**HENRIQUE MACHADO CEZAR**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS TALOS DE *CROTON VELUTINUS* BAILL E  
ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM BASILICUM*  
VAR. *PURPURASCENS* BENTH E DE SEUS DERIVADOS POR ESPECTROSCOPIA  
ORDENADA POR DIFUSÃO (DOSY)**

**FORTALEZA – CE**

**2016**

**HENRIQUE MACHADO CEZAR**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS TALOS DE *CROTON VELUTINUS* BAILL E  
ANÁLISE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM BASILICUM*  
VAR. *PURPURASCENS* BENTH E DE SEUS DERIVADOS POR ESPECTROSCOPIA  
ORDENADA POR DIFUSÃO (DOSY)**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil

**FORTALEZA – CE**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C419e Cezar, Henrique Machado.

Estudo fitoquímico dos talos de *Croton velutinus* baill e análise dos componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH e de seus derivados por espectroscopia ordenada por difusão (DOSY) / Henrique Machado Cezar. – 2016.

160 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.

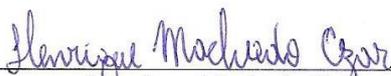
Orientação: Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil.

1. *Croton velutinus*. 2. óleo essencial. 3. Eugenol. 4. DOSY. 5. MAD. I. Título.

CDD 540

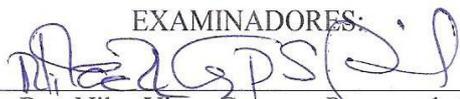
---

Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

  
Henrique Machado Cezar

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/07/2016

EXAMINADORES:



Prof. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Daniel Esdras de Andrade Uchoa  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – (EMBRAPA)

## AGRADECIMENTOS

Primordialmente a Deus pela perseverança a mim concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

A meus Pais que me encorajaram desde o início a sempre continuar e manter o otimismo diante das dificuldades.

A professora Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil, pela orientação e tempo dedicado durante a realização desta pesquisa.

Aos amigos do LAFIPLAM, Debora, Paula, Regivaldo, Davi, Herbert, Isabelle, Thaizy e em especial aos amigos Fábio, João Vito, Hélio e João Evangelista pelo período de convivência e dicas preciosas sobre prática de laboratório no decorrer da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFC pelos conhecimentos a mim transmitidos.

Aos funcionários do curso de Pós-Graduação em Química (UFC): Célia, Lana e Orlando, pela ajuda e suporte técnico.

Aos professores Edilberto Rocha Silveira e Marcos Esmeraldo Bezerra, que fizeram a coleta do material botânico e forneceram as fotos das espécies em estudo.

As professoras Antônia Pimenta e Mary Anne Souza Lima pela utilização de materiais e equipamentos de laboratório necessários em parte da pesquisa.

A professora Maria Teresa Salles Trevisan e a pesquisadora Irvila Ricarte pelos estudos larvicida, inibição das enzimas acetilcolinesterase e angiotensina I realizados com os extratos de *Croton*, das substâncias e óleos essenciais obtidos.

A professora Tamara Gonçalves Araújo pelo estudo antioxidante dos extratos de *Croton*.

Ao doutorando Francisco das Chagas Pinto (Chaguinha) pelas contribuições na determinação estrutural dos compostos isolados.

Ao CENAUREMN pela oportunidade de operar os equipamentos como também na obtenção dos espectros de RMN.

Ao LEMANOR e aos operadores de Infravermelho (Pedro Henrique) e do Espectrometro de Massa (Fábio e Romézio) pela obtenção dos espectros.

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro ao curso de Pós-Graduação. Em particular ao CNPq pela bolsa de pesquisa a mim concedida.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Croton velutinus* Baill é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae encontrada na cadeia do espinhaço, região que compreende os estados de Minas Gerais e Bahia, ocorrendo em campos rupestres e solo arenoso. Várias espécies de *Croton* têm sido estudadas devido às suas diferentes aplicações terapêuticas. A espécie *C. velutinus* ainda não apresenta estudos fitoquímicos descritos na literatura, o que motivou a investigação química e farmacológica desta planta. Os extratos hexânico e etanólico dos talos de *C. velutinus* foram submetidos a procedimentos cromatográficos resultando no isolamento de dois flavonoides Casticina e 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona, dois sesquiterpenos, (6*S*,7*S*) 7,11-diidroxi-bisabol-2-en-4-ona e delobanona, e um diterpeno clerodano inédito na literatura, o ácido velutinóico. Os extratos de *Croton velutinus* foram submetidos a ensaios de atividades larvicida, antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase e da enzima conversora da angiotensina I. A segunda parte deste trabalho consistiu na análise do óleo essencial de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH, planta conhecida como alfavaca roxa, por CG-EM e DOSY. Os componentes majoritários identificados no óleo essencial foram eugenol (65,2%) e  $\beta$ -cariofileno (23,4%), os quais foram isolados e analisados por DOSY assistida por matriz (MAD) utilizando o surfactante não iônico Brij 78 como matriz. Foram preparados os derivados do eugenol: acetato de eugenila, *cis* e *trans*-isoeugenol, para serem analisados por MAD em misturas binárias e ternárias contendo vanilina como um dos componentes. Os coeficientes de difusão do eugenol e  $\beta$ -cariofileno no óleo essencial variaram consideravelmente com a mudança do solvente de  $CDCl_3$  para a mistura  $DMSO-d_6:D_2O$  (1:1) com separação de  $\Delta EC$  de 7,27% para  $\Delta EC$  89,12%, respectivamente, enquanto a mistura binária destes compostos variou de  $\Delta EC$  9,39% para 98,33%. A mistura de eugenol e vanilina a 10 mM mostrou separação de  $\Delta EC$  de 35,5% na presença de 40 mM de Brij 78. As atividades larvicidas do óleo essencial, eugenol e dos derivados foram obtidas frente às larvas no 3º estágio do mosquito *Aedes aegypti*, sendo o óleo essencial o mais eficiente. As substâncias químicas isoladas tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectroscópicos (EM, IV e RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , incluindo técnicas uni e bidimensionais) além de comparação com dados da literatura.

Palavras-chave: *Croton velutinus*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*, óleo essencial, eugenol, DOSY, MAD, Brij 78, atividade larvicida, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

*Croton velutinus* Baill is a plant belonging to the family Euphorbiaceae found in the “cadeia do espinhaço”, that comprises the States of Minas Gerais and Bahia, occurring in rocky fields and sandy soils. Several species of *Croton* have been studied due to different therapeutics applications. There is no report about the phytochemical study of *C. velutinus* found in the literature. The hexane and ethanolic extracts of stalks of *C. velutinus* were subjected to chromatographic procedures, resulting in isolation of two flavonoids, Casticin and 5-hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone, two sesquiterpenes (6*S*,7*S*) 7,11-dihydroxi-bisabol-2-en-4-one and Delobanone and a inedited diterpene clerodane, velutinoic acid. The extracts of *Croton velutinus* were subjected to assays of larvicidal, antioxidant activities, acetylcholinesterase enzyme inhibition and angiotensin I converting enzyme inhibitors. The second part of this work, consisted in essential oil analysis of *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH, plant known like alfavaca roxa by GC-MS and DOSY. The major components in the essential oil were identified as eugenol (65,2%) and  $\beta$ -caryophyllene (23,4%). The resolution of eugenol and  $\beta$ -caryophyllene was performed by Matriz-assisted DOSY (MAD) using the non-ionic surfactant Brij 78 as matrix. Were prepared eugenol derivatives: eugenyl acetate, *cis* and *trans*-isoeugenol, for to be analyzed by MAD in binary and ternary mixtures containing vanillin like one of components. The diffusion coefficients of eugenol and  $\beta$ -caryophyllene in the essential oil vary considerably with the change of solvent of  $\text{CDCl}_3$  to the mixture  $\text{DMSO-d}_6$ : $\text{D}_2\text{O}$  (1:1) with  $\Delta\text{EC}$  7,27% to  $\Delta\text{EC}$  89,12% separation, respectively, whereas the binary mixture of this compounds vary of  $\Delta\text{EC}$  9,39% to 98,33%. The eugenol and vanillin 10 mM mixture showed the variation of  $\Delta\text{EC}$  35,5% in presence of Brij 78. The larvicidal activity of essential oil, eugenol and their derivatives were obtained from 3<sup>rd</sup> stage larvae of mosquito *Aedes aegypti*, and the essential oil showed the most efficient. The structural characterization of the isolated compounds was achieved by spectroscopy methods (MS, IR and NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , including one and two dimensional techniques) and by comparison with literature dates.

**Keywords:** *Croton velutinus*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*, essential oil, eugenol, DOSY, MAD, Brij 78, larvicidal activity, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa de distribuição geográfica de <i>C. velutinus</i> no Brasil .....	24
<b>Figura 2</b> - Foto de <i>C. velutinus</i> . A: População. B e C: Folhas e inflorescências .....	25
<b>Figura 3</b> - Cromatograma de CLAE de CV-01 .....	29
<b>Figura 4</b> - Cromatograma de CLAE de CV-03 .....	35
<b>Figura 5</b> - Cromatograma de CLAE de CV-04 .....	37
<b>Figura 6</b> – Estrutura básica de uma flavona .....	43
<b>Figura 7</b> - Casticina .....	46
<b>Figura 8</b> - Espectro de absorção no infravermelho de CV-01 .....	47
<b>Figura 9</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 .....	48
<b>Figura 10</b> - Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 .....	48
<b>Figura 11</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 .....	49
<b>Figura 12</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 .....	49
<b>Figura 13</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 (Expansão) .....	50
<b>Figura 14</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 .....	50
<b>Figura 15</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01 (Expansão) .....	51
<b>Figura 16</b> - 5 - hidroxí-3, 6, 7, 4'-tetrametoxiflavona (CV-02) .....	54
<b>Figura 17</b> - Espectro de absorção no infravermelho de CV-02 .....	55
<b>Figura 18</b> - Espectro de Massa (IE, 70 eV) de CV-02 .....	55
<b>Figura 19</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-02 .....	56
<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-02 .....	56
<b>Figura 21</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-02 .....	57
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) CV-02 .....	57
<b>Figura 23</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) CV-02 (Expansão) .....	58
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-02 .....	58
<b>Figura 25</b> - Esqueleto tipo bisabolano .....	60
<b>Figura 26</b> - Estruturas dos compostos Indicumenona (A) e (6 <i>S</i> , 7 <i>S</i> ) – 7,11 – diidroxí--bisabol-2-en-4-ona (B) .....	63
<b>Figura 27</b> - Espectro de absorção na região do Infravermelho de CV-03 .....	64
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 .....	65

<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 .....	65
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 .....	66
<b>Figura 31</b> - Espectro de RMN 2D COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03.....	66
<b>Figura 32</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 ....	67
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN 2D HSQC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 (Expansão).....	67
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 ...	68
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 (Expansão).....	68
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN 2D HMBC <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (500x125MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 (Expansão 2).....	69
<b>Figura 37</b> - Espectro de RMN NOESY 2D <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03 (Expansão).....	69
<b>Figura 38</b> - 7-hidroxi-bisabola-2,10-dien-4-ona (Delobanona) .....	74
<b>Figura 39</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04.....	75
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN DEPT 135° (75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 .....	75
<b>Figura 41</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 .....	76
<b>Figura 42</b> - Espectro de RMN COSY 2D <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04.....	76
<b>Figura 43</b> - Espectro de RMN COSY 2D <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 (Expansão).....	77
<b>Figura 44</b> - Espectro de RMN HSQC 2D <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (300 x 75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 ....	77
<b>Figura 45</b> - Espectro de RMN HSQC 2D <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (300 x 75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 (Expansão).....	78
<b>Figura 46</b> - Espectro de RMN HMBC 2D <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (300x75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 .....	78
<b>Figura 47</b> - Espectro de RMN HMBC 2D <sup>1</sup> Hx <sup>13</sup> C (300x75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 (Expansão).....	79
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN HMBC <sup>1</sup> Hx <sup>13</sup> C (300x75MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04 (Expansão 2).....	79
<b>Figura 49</b> - Esqueleto tipo clerodano .....	81
<b>Figura 50</b> - Estruturas dos compostos Crotinsulactona (A) e Ácido velutinóico (B).....	85
<b>Figura 51</b> - Espectro de absorção no infravermelho de CV-05 .....	86
<b>Figura 52</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-05 .....	87
<b>Figura 53</b> - Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-05.....	87
<b>Figura 54</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-05 .....	88
<b>Figura 55</b> - Espectro de RMN 2D COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CV-05 .....	88

<b>Figura 56</b> - Espectro de RMN 2D COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)	89
<b>Figura 57</b> - Espectro de RMN HSQC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500x125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05	89
<b>Figura 58</b> - Espectro de RMN HSQC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500x125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)	90
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN 2D HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500x125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05	90
<b>Figura 60</b> - Espectro de RMN 2D HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500x125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)	91
<b>Figura 61</b> - Espectro de RMN 2D HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500x125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão 2)	91
<b>Figura 62</b> - Espectro de RMN 2D $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05	92
<b>Figura 63</b> - Porcentagem de inibição do radical DPPH dos extratos de <i>Croton velutinus</i>	96
<b>Figura 64</b> - Fotos de <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> . A-canteiro de cultivo; B- detalhes das folhas e inflorescências	101
<b>Figura 65</b> - Exsicata de <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> BENTH	101
<b>Figura 66</b> - Cromatograma de CG-EM de OEAR	106
<b>Figura 67</b> - Estruturas com deslocamento químico de RMN $^1\text{H}$ do eugenol (A) e $\beta$ -cariofileno (B)	106
<b>Figura 68</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de OEAR	107
<b>Figura 69</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do eugenol	108
<b>Figura 70</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) dos confôrmeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do $\beta$ -cariofileno	110
<b>Figura 71</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) dos confôrmeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do $\beta$ -cariofileno	111
<b>Figura 72</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1	112
<b>Figura 73</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1	112
<b>Figura 74</b> - Acetato de eugenila (OEC-1)	113
<b>Figura 75</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-4 ( <i>Cis</i> -isoeugenol)	115
<b>Figura 76</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-4 ( <i>Cis</i> -isoeugenol)	115
<b>Figura 77</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-5 ( <i>Trans</i> -isoeugenol)	116
<b>Figura 78</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-5 ( <i>Trans</i> -isoeugenol)	117
<b>Figura 79</b> - Estruturas do <i>cis</i> -isoeugenol (A) e <i>trans</i> -isoeugenol (B)	118
<b>Figura 80</b> - Sequência de ecos de spin de Hahn	121
<b>Figura 81</b> - Sequência de pulsos spin-eco PFGSE (Adaptado: CLARIDGE, 2009)	122

<b>Figura 82</b> - Sequência de pulsos com ecos de spin estimulado PFGSTE (Adaptado: CLARIDGE, 2009).....	123
<b>Figura 83</b> - Sequência de pulsos One-shot (FONTE: PELTA, <i>et al.</i> , 2002).....	135
<b>Figura 84</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com 1,0 mg de OEAR .....	137
<b>Figura 85</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com 1,0 mg de β-cariofileno e eugenol .....	137
<b>Figura 86</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com 1,0 mg de OEAR .....	138
<b>Figura 87</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com 1,0 mg de β-cariofileno e eugenol .....	138
<b>Figura 88</b> - Surfactante Brij 78.....	140
<b>Figura 89</b> - Valores do coeficiente de difusão ( $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 do eugenol, vanilina e Brij 78 variando a concentração de eugenol e vanilina .....	140
<b>Figura 90</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com 10 mM de EVA .....	141
<b>Figura 91</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 30mM .....	141
<b>Figura 92</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 20mM e Brij 78 30mM .....	142
<b>Figura 93</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 30mM e Brij 78 30mM .....	142
<b>Figura 94</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 50mM e Brij 78 30mM .....	143
<b>Figura 95</b> - Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 do eugenol e vanilina 10mM e Brij 78 variando a concentração de Brij 78.....	144
<b>Figura 96</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 10mM .....	144
<b>Figura 97</b> - Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 20mM .....	145
<b>Figura 98</b> - Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 40mM .....	145
<b>Figura 99</b> - Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 para o eugenol, vanilina e acetato de eugenila 1,0 mg cada com e sem adição de Brij 78 40 mM ..	147
<b>Figura 100</b> - Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com 1,0 mg de cada componente de EVAc .....	147
<b>Figura 101</b> - Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1) com 1,0mg de cada componente EVAc e 40mM de Brij 78 .....	148

<b>Figura 102</b> - Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1 do eugenol, <i>cis</i> -isoeugenol, <i>trans</i> -isoeugenol e Brij 78 variando a concentração de Brij 78.....	149
<b>Figura 103</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol .....	150
<b>Figura 104</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol e Brij 78 40mM .....	150
<b>Figura 105</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol e Brij 78 40mM (Expansão) .....	151
<b>Figura 106</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol e Brij 78 80mM .....	151
<b>Figura 107</b> - Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol e Brij 78 80mM (Expansão) .....	152

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b> - Isolamento do constituinte CV-01.....	30
<b>Fluxograma 2</b> - Isolamento do constituinte CV-02.....	33
<b>Fluxograma 3</b> - Isolamento do constituinte CV-03.....	35
<b>Fluxograma 4</b> - Isolamento do constituinte CV-04.....	37
<b>Fluxograma 5</b> - Isolamento do constituinte CV-05.....	38
<b>Fluxograma 6</b> - Esquema de obtenção do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> (alfavaca roxa)..	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados referentes á obtenção dos extratos de <i>Croton velutinus</i> .....	26
<b>Tabela 2</b> - Partição do extrato etanólico CVET .....	26
<b>Tabela 3</b> - Frações da coluna cromatográfica do extrato hexânico CVHT .....	27
<b>Tabela 4</b> - Frações da coluna cromatográfica CVET-D2.....	28
<b>Tabela 5</b> - Frações da coluna cromatográfica CVET-D2F.....	28
<b>Tabela 6</b> - Frações da coluna cromatográfica da fração CVHT-D2 .....	31
<b>Tabela 7</b> - Frações da coluna cromatográfica da fração DCM-2.4 .....	31
<b>Tabela 8</b> - Frações da coluna cromatográfica de DCM-2.4 (G) e DCM-2.4 (H).....	32
<b>Tabela 9</b> - Frações da coluna cromatográfica de CVET-Ac .....	34
<b>Tabela 10</b> - Frações da coluna Sephadex-LH20 de CVET-E .....	36
<b>Tabela 11</b> - Frações da coluna cromatográfica de CVET-D1 .....	38
<b>Tabela 12</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlações de HSQC e HMBC ( <sup>2</sup> J e <sup>3</sup> J) (CDCl <sub>3</sub> ) de CV-01, comparado com valores da literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ).....	47
<b>Tabela 13</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlações de HSQC e HMBC ( <sup>2</sup> J e <sup>3</sup> J) (CDCl <sub>3</sub> ) de CV-02, comparado com valores da literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ).....	54
<b>Tabela 14</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlações de HSQC e HMBC ( <sup>2</sup> J e <sup>3</sup> J) (DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-03, comparado com valores da literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ).....	64
<b>Tabela 15</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlações de HSQC e HMBC ( <sup>2</sup> J e <sup>3</sup> J) (DMSO-d <sub>6</sub> ) de CV-04, comparado com valores da literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) .....	74
<b>Tabela 16</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlações de HSQC e HMBC ( <sup>2</sup> J e <sup>3</sup> J) (CDCl <sub>3</sub> ) de CV-05, comparado com valores da literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD).....	86
<b>Tabela 17</b> - Amostras de <i>Croton velutinus</i> submetidas ao ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase .....	94
<b>Tabela 18</b> - Valores de porcentagem de inibição do radical DPPH dos extratos de <i>Croton velutinus</i> .....	96
<b>Tabela 19</b> - Dados da mortalidade das larvas no 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> das amostras de <i>Croton velutinus</i> .....	97
<b>Tabela 20</b> - Tempo e porcentagem do eluentes A e B .....	99
<b>Tabela 21</b> - Porcentagem de inibição da enzima angiotensina I do extrato CVET e da casticina (CV-01).....	99
<b>Tabela 22</b> - Perfil dos constituintes químicos das partes aéreas de OEAR.....	105
<b>Tabela 23</b> - Frações obtidas da coluna cromatográfica da fração orgânica de OEC.....	109
<b>Tabela 24</b> - Valores de deslocamento de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) dos confôrmeros βα e ββ do β-cariofileno comparados com a literatura (CDCl <sub>3</sub> ).....	110

<b>Tabela 25</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de OEC-1 comparados aos dados da literatura ....	113
<b>Tabela 26</b> - Frações obtidas da coluna cromatográfica de OEC-3 .....	114
<b>Tabela 27</b> - Deslocamento químico de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ISO-4 comparado com dados da literatura .....	116
<b>Tabela 28</b> - Deslocamento químico de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ISO-5 comparado com dados da literatura.....	117
<b>Tabela 29</b> - Concentrações letais (mg/L) para 50% das larvas de <i>Aedes aegypti</i> no 3º estágio .....	119
<b>Tabela 30</b> - Matrizes utilizadas em experimento de MAD.....	125
<b>Tabela 31</b> - Coeficientes de difusão (10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) em CDCl <sub>3</sub> e DMSO-d <sub>6</sub> :D <sub>2</sub> O 1:1 para o eugenol e β-cariofileno no óleo OEAR e isolados .....	136
<b>Tabela 32</b> - Coeficientes de difusão (10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 variando a concentração de eugenol e vanilina .....	140
<b>Tabela 33</b> - Coeficientes de difusão (10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 para o eugenol, vanilina e Brij 78 variando a concentração de Brij 78 .....	143
<b>Tabela 34</b> - Coeficientes de difusão (10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 para o eugenol, vanilina e acetato de eugenila com e sem adição de Brij 78 .....	146
<b>Tabela 35</b> - Coeficientes de difusão (10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) DMSO-d <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O 1:1 para o eugenol, <i>cis</i> e <i>trans</i> - isoeugenol e Brij 78 .....	149

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
BB	Broad Band
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a um Espectrômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
CVET	Extrato Etanólico dos Talos de <i>Croton velutinus</i>
CVHT	Extrato Hexânico dos Talos de <i>Croton velutinus</i>
D <sub>2</sub> O	Óxido de Deutério
DEPT	<i>Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil Sulfóxido Deuterado
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
EM	Espectrometria de Massa
EVA	Eugenol e Vanilina
EVAc	Eugenol, Vanilina e Acetato de eugenila
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IE	Ionização por elétrons
IK	Índice de Kovats
IV	Infravermelho
LEMANOR	Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste
MAD	Matrix Assisted DOSY
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OEAR	Óleo Essencial da Alfavaca Roxa
OEC	Óleo Essencial do Cravo-da-Índia
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - 1

## SUMÁRIO

<b>1.0 - INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2.0 - CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b> .....	22
<b>2.1 - Considerações sobre a família Euphorbiaceae</b> .....	22
<b>2.2 - Considerações sobre o gênero <i>Croton</i></b> .....	23
<b>2.3 - Considerações sobre a espécie <i>Croton velutinus</i> Baill</b> .....	24
<b>3.0 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	26
<b>3.1 - Obtenção dos extratos etanólico e hexânico dos talos de <i>Croton velutinus</i> Baill</b> ....	26
<b>3.1.1 - Tratamento cromatográfico de CVET</b> .....	26
<b>3.1.2 - Tratamento cromatográfico de CVHT</b> .....	27
<b>3.1.3 – Isolamento do constituinte químico CV-01</b> .....	27
<b>3.1.4 – Isolamento do constituinte químico CV-02</b> .....	30
<b>3.1.5 – Isolamento do constituinte químico CV-03</b> .....	33
<b>3.1.6 – Isolamento do constituinte químico CV-04</b> .....	36
<b>3.1.7 – Isolamento do constituinte químico CV-05</b> .....	37
<b>3.2 – Procedimentos cromatográficos</b> .....	39
<b>3.2.1 – Cromatografia de Adsorção</b> .....	39
<b>3.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</b> .....	39
<b>3.2.3 – Cromatografia de Exclusão</b> .....	39
<b>3.2.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	39
<b>3.3 – Métodos Espectroscópicos</b> .....	40
<b>3.3.1 – Espectroscopia da região do Infravermelho</b> .....	40
<b>3.3.2 – Espectrometria de Massa (EM)</b> .....	40
<b>3.3.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	40
<b>4.0 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	42
<b>4.1 - Determinação estrutural de CV-01</b> .....	42
<b>4.2 - Determinação estrutural de CV-02</b> .....	52
<b>4.3 - Determinação estrutural de CV-03</b> .....	59
<b>4.4 - Determinação estrutural de CV-04</b> .....	70
<b>4.5 - Determinação estrutural de CV-05</b> .....	80
<b>5.0 - ATIVIDADES REALIZADAS COM OS EXTRATOS DE <i>Croton velutinus</i></b> .....	93

5.1 – Avaliação da inibição da enzima acetilcolinasterease .....	93
5.2 – Ensaio de atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH.....	94
5.3 – Atividade larvicida frente às larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	97
5.4 – Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE) .....	98
<b>6.0 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>OCIMUM BASILICUM</i> VAR. <i>PURPURASCENS</i> BENTH (ALFAVACA ROXA).....</b>	<b>100</b>
6.1 - Estudo dos constituintes voláteis de <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> BENTH (Alfavaca roxa).....	102
6.2 - Avaliação da composição volátil da alfavaca roxa.....	104
6.3 - Obtenção do eugenol a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC).....	107
6.4 - Obtenção do $\beta$ -cariofileno a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC)...	109
6.5 - Reação de acetilação do eugenol .....	111
6.6 - Reação de isomerização do eugenol .....	113
6.7 - Ensaio de atividade larvicida dos óleos essenciais OEAR, OEC, eugenol e acetato de eugenila.....	118
<b>7.0 - DIFUSÃO MOLECULAR .....</b>	<b>120</b>
7.1 - Difusão por RMN .....	121
7.1.1 – <i>O método de Hahn</i> .....	121
7.1.2 – <i>Sequencia de Eco de Spin com Gradiente de Campo Pulsado (PFGSE)</i> .	122
7.1.3 – <i>Sequencia de Eco de Spin Estimulado (PFGSTE)</i> .....	122
7.1.4 – <i>Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY)</i> .....	123
7.1.5 – <i>Espectroscopia Ordenada por Difusão Assistida por Matriz (MAD)</i> .....	124
<b>8.0 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>125</b>
8.1 – Polímeros .....	129
8.1.1 – <i>Carragenina</i> .....	129
8.1.2 – <i>Polímeros sintéticos</i> .....	130
8.1.3 – <i>Polibutílicoacrilato</i> .....	130
8.1.4 – <i>Polivinilpirrolidona (PVP)</i> .....	130
8.1.5 – <i>Polietilenoglicol (PEG)</i> .....	130
8.1.6 – <i>Polidimetiloxano (PDMS)</i> .....	131
8.2 - Surfactantes não iônicos .....	131
8.2.1 – <i>Brij 78 e 98</i> .....	131
8.2.2 – <i>Igepal CA-520</i> .....	131

<b>8.3</b> - Surfactantes iônicos.....	131
8.3.1 – Dodeciltrimetilamônio (DTAB) .....	131
8.3.2 – Cetiltrimetilamônio (CTAB) .....	132
8.3.3 – Dodecil sulfato de sódio (SDS).....	132
8.3.4 – Dioctil sulfocinato de sódio (AOT).....	132
<b>8.4</b> - Oligossacarídeos.....	133
8.4.1 – $\alpha$ e $\beta$ - ciclodextrina .....	133
<b>8.5</b> - Reagentes de deslocamento.....	133
8.5.1 – $Eu(fod)_3$ .....	133
<b>9.0</b> - SURFACTANTES BRIJ <sup>®</sup> .....	134
<b>10.0</b> - EXPERIMENTOS DE DOSY.....	134
<b>10.1</b> - Resolução dos componentes majoritários de OEAR por DOSY.....	135
<b>10.2</b> - Resolução de misturas por MAD utilizando Brij 78 como matriz.....	139
10.2.1 – Eugenol e vanilina (EVA).....	139
10.2.2 – Eugenol, vanilina e acetato de eugenila (EVAc).....	146
10.2.3 – Eugenol, cis e trans-isoeugenol (ECT).....	148
<b>11.0</b> - CONCLUSÃO.....	153
<b>12.0</b> - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	154

## 1.0 INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais representa, dentro da área de pesquisa com plantas medicinais, uma ciência de grande importância e valor, na medida em que somente por meio dos métodos utilizados nessa área pode-se obter tanto o isolamento e a purificação de novos compostos como a correta determinação estrutural e posterior síntese total ou parcial (STASI, 1996). Os estudos dos metabólitos secundários de plantas se desenvolveram aceleradamente nos últimos 50 anos. Estes compostos são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes e também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (FUMAGALI *et al.*, 2008).

O uso de produtos extraídos de plantas com propósitos medicinais, é relatado desde o início da civilização até o final do século XIX onde se tratava da principal fonte de medicamentos. Desde então, não só a importância como a expansão dos estudos nessa área tem variado de acordo com as estratégias de grandes empresas farmacêuticas (GOMES, 2001). No Brasil, do ponto de vista da história natural e da química de produtos naturais, a massa de informações sobre a flora e fauna brasileiras só seria constituída efetivamente no século XIX, tendo em vista que a prática científica demandava a existência de instituições, redes de circulação de textos, museus e coleções, além da formação de especialistas em quantidade adequada (PINTO; ALENCASTRO; SANTOS, 2007).

Apesar do número crescente de estudos na área de química de produtos naturais, os dados disponíveis revelam que somente 5 a 10% foram quimicamente estudadas na busca de compostos bioativos e apenas 15 a 17% quanto ao seu potencial medicinal (CRAGG *et al.*, 1997; SOEJARTO, 1996). Não existe precisão sobre o número de plantas existentes no globo terrestre, mais há uma estimativa de 250.000. Dados estatísticos apontam o Brasil como o país com a maior biodiversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, das quais apenas 8% foram estudadas em busca de componentes químicos bioativos (SIMÕES *et al.*, 2004).

O gênero *Croton* pertence a família Euphorbiaceae que é uma das maiores e mais diversificadas famílias das Angiospermas. Encontra-se distribuído especialmente nos trópicos, nos mais variados tipos de vegetação e habitats (SECCO, *et al.* 2012). Na literatura são encontrados estudos das mais variadas espécies do gênero *Croton* relacionando-as ao uso tradicional como plantas medicinais, principalmente na África, Ásia e América do Sul. A classe de compostos mais comum no gênero *Croton* é representada pelos diterpenos que podem ser encontradas em várias espécies da América, África e Ásia (SALATINO, *et al.*,

2007). Contudo na literatura também são relatados para o gênero a ocorrência de outras classes de compostos como triterpenos, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos como flavonoides.

Embora o gênero *Croton* tenha sido largamente estudado, a espécie *Croton velutinus* Baill ainda não possui registro de estudo fitoquímico, o que motivou uma investigação fitoquímica dessa espécie visando novas substâncias bioativas, tais como antioxidante, larvicida, inibidoras das enzimas acetilcolinesterase, associada às causas do mal de Alzheimer, e inibição da enzima conversora da angiotensina I associada às causas da hipertensão.

## 2.0 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae apresenta cerca de 334 gêneros e mais de 8000 espécies distribuídas nas regiões tropicais do planeta (WEBSTER, 1994; SALATINO, SALATINO e NEGRI, 2007). Esta família é uma das mais diversificadas e complexas das Angiospermas, devido à grande variação morfológica dos gêneros e espécies, a ampla distribuição geográfica e a ocupação de diferentes ambientes, além da conhecida importância econômica de alguns dos seus representantes. Plantas de Euphorbiaceae são geralmente latescentes, monoicas ou dioicas, com flores diclinas, sendo as flores pistiladas muito características pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpelar. O fruto é geralmente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos, sendo conhecido como cápsula tricoca (TORRES, 2009; SÁTIRO e ROQUE, 2008).

No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies e 72 gêneros encontrados principalmente na região Nordeste, contendo cerca de 240 espécies divididas em 50 gêneros, distribuídos em sua grande maioria nas áreas da Caatinga (OLIVEIRA, 2013).

A classificação da família Euphorbiaceae foi proposta por Webster (1975) subdividindo-a em cinco subfamílias, que eram separadas em dois grupos de acordo com o número de óvulos por lóculo do ovário: Phyllanthoideae e Oldfieldioideae, ambos com dois óvulos e Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorioideae, com um óvulo. Em uma classificação estendida englobando as cinco famílias, Webster (1994) propôs novas tribos e subtribos no mesmo estudo (SECCO, *et al.*, 2012; WEBSTER, 1994).

A família Euphorbiaceae se destaca como uma das mais importantes economicamente. A seringueira, *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss) Müll. Arg, de onde se extrai látex utilizado para a manufatura de borracha natural, é extensamente cultivada em alguns trechos da floresta amazônica e das florestas do arquipélago malaio. Algumas espécies se destacam como plantas ornamentais pela beleza das brácteas ou folhas como o caso do bico de papagaio, *Euphorbia pulcherrima* Willd e da coroa de cristo *Euphorbia milii* Des Moul (RODRIGUES, 2007).

As sementes e o látex de algumas espécies são tóxicos ao homem, como por exemplo, a purga de cavalo, *Joanesia principis* Vell. e *Euphorbia tirucalli* L. conhecida no Nordeste como cega-olho. Podem causar graves acidentes quando em contato com mucosas principalmente dos olhos ou quando ingeridas (RODRIGUES, 2007).

## 2.2 Considerações sobre o gênero *Croton*

O gênero *Croton* pertence à subfamília Crotonoideae, e é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae e conta com mais da metade das espécies desta subfamília. Este gênero apresenta cerca de 1200 espécies, com distribuição pantropical, seguido, em tamanho, por *Jatropha* ( $\pm 185$  espécies) e *manihot* ( $\pm 100$  espécies). Na América do Sul, o Brasil é o país melhor representado, congregando cerca de 250 a 300 espécies que incluem ervas, subarbustos e árvores, a maioria delas encontrada em vegetações abertas ou florestas secas, mas também representadas em matas úmidas (LIMA e PIRANI, 2003, 2007; TORRES, 2009).

Segundo Lima e Pirani (2003), as características das plantas do gênero *Croton* podem ser descritas como:

[...] São plantas arbóreas, arbustivas, ou herbáceas, indumentadas em pelo menos algumas de suas partes (ramos, folhas, inflorescências, entre outras), monoicas ou dioicas, caracterizadas, fundamentalmente, pela associação dos seguintes caracteres: folhas simples, geralmente com glândulas no ápice do pecíolo ou na base da lâmina; inflorescências racemosas ou pseudo-racemosas, com uma ou várias flores por bráctea, uni ou bissexuadas; flores estaminadas diclamídeas, com 3-400 estames, cujos filetes são, caracteristicamente, encurvados no botão; grãos de pólen esféricos, inaperturados, com a sexina mais espessa do que a nexina, formada por excrescências triangulares ou circulares (padrão croton). As flores pistiladas são, geralmente monoclamídeas, com gineceu de três lóculos uniovulados, três estiletos inteiros, bífidus ou ramificados várias vezes. Os frutos, esquizocarpos ou cápsulas loculicidas, possuem uma semente endospermada e carunculada por lóculo, com testa lisa ou ornamentada (LIMA e PIRANI, 2003)

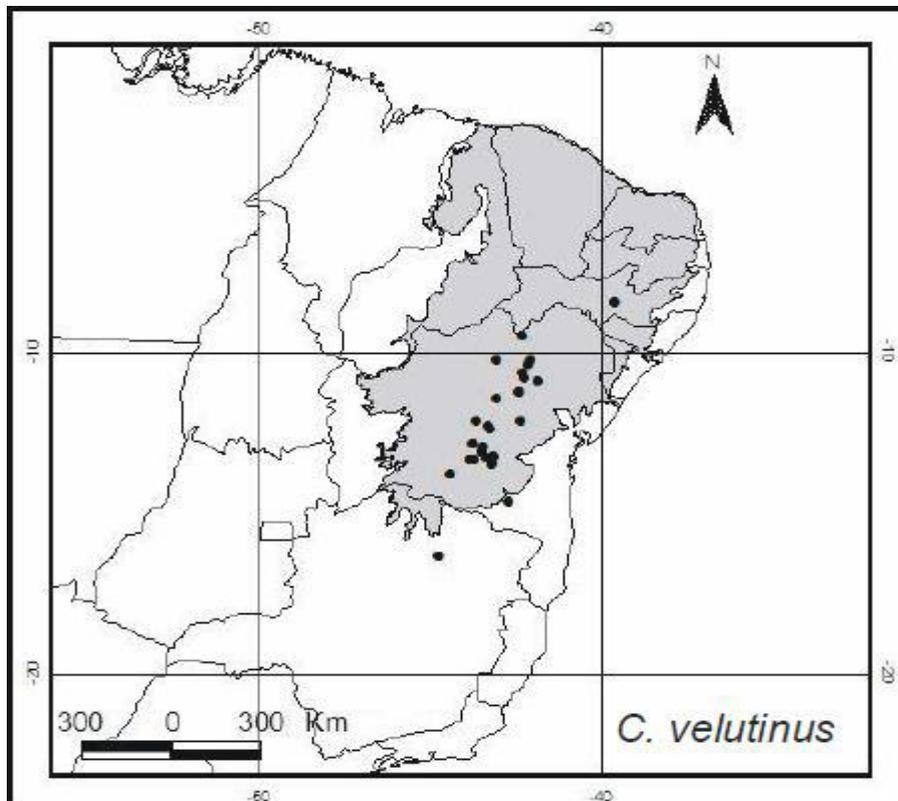
No gênero *Croton* são encontradas diversas classes de compostos do metabolismo secundário como alcaloides e diterpenos, dos quais os mais comuns encontrados no gênero são os clerodanos, cembranóides, halimanos, cauranos, labdanos, ésteres do forbol, traquilobanos e sarcopetalanos. Substâncias fenólicas como flavonoides também tem sido frequentemente relatadas no gênero (SALATINO, 2007).

Várias espécies de *Croton* são usadas na medicina tradicional e tais usos incluem o tratamento de câncer, problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (SALATINO, 2007).

### 2.3 Considerações sobre a espécie *Croton velutinus* Baill

*Croton velutinus* Baill é uma planta largamente encontrada entre a Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais) e no semi-árido pernambucano, ocorrendo em campos rupestres e cerrados sobre solo arenoso, entre 500 a 1400 metros de altitude. Em Pernambuco, foi observada apenas em vegetação de caatinga, em áreas antropizadas sobre solo arenoso (SILVA, 2010). A Figura 1 apresenta o mapa de distribuição geográfica desta espécie em território brasileiro.

**Figura 1:** Mapa de distribuição geográfica de *C. velutinus* no Brasil (TORRES, 2009)



Cordeiro (1995) define a planta com brácteas lanceoladas e as flores estaminadas com cerca de 10 estames, destituída de estípulas, além de possuir venação broquidódroma e com estiletos bífidos. Por outro lado, Torres, (2009) define que a espécie é facilmente reconhecida por apresentar ramos ferrugíneos, folhas cartáceas, ovais a deltoides, com face abaxial velutina e adaxial glabrescente, mas com estiletos tetráfidos.

A espécie *Croton velutinus* Baill (Figura 2), planta estudada nesse trabalho, foi coletada na cachoeira do Fraga região centro-sul do Estado da Bahia, pelo Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira.

**Figura 2:** Foto de *C. velutinus*. A: População. B e C: Folhas e inflorescências

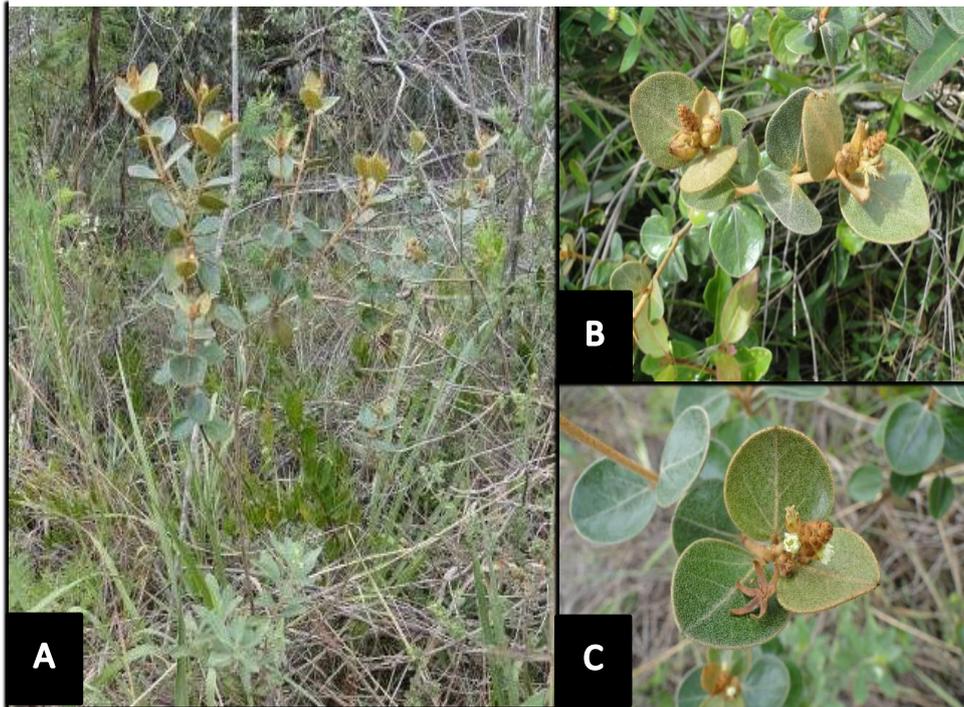


Foto: Professor Edilbero Rocha Silveira

### 3.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Obtenção dos extratos etanólico e hexânico dos talos de *Croton velutinus* Baill

Os talos de *Croton velutinus* foram secos à temperatura ambiente por 15 dias e triturados, resultando em torno de 1,7 kg de material que foi submetido extrações a frio por 7 dias com hexano (3x) seguido por etanol (3x). O extrato bruto foi obtido a partir da remoção do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 40 °C resultando nos extratos denominados CVHT e CVET, respectivamente, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados referentes à obtenção dos extratos de *Croton velutinus*.

EXTRATOS	SIGLA	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
Extrato hexânico dos talos de <i>Croton velutinus</i>	CVHT	18,1	0,3
Extrato etanólico dos talos de <i>Croton velutinus</i>	CVET	110,8	2,3

##### 3.1.1 Tratamento cromatográfico de CVET

Uma alíquota de 45,3g de CVET foi solubilizada em 550 mL de uma solução de metanol:água (70:30) (v:v), submetida a uma partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano, diclorometano (2x) e acetato de etila. Foram obtidas um total de 6 frações denominadas: CVET-H, CVET-D1, CVET-D2, CVET-Ac, CVET-E e CVET-Aq como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Partição do extrato etanólico CVET

FRAÇÃO	ELUENTE	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
CVET-H	Hexano	1,9	4,2
CVET-D1	Diclorometano	1,4	3,1
CVET-D2	Diclorometano	8,8	19,4
CVET-Ac	Acetato de Etila	4,4	9,7
CVET-E	Emulsão	1,4	3,1
CVET-HA	Hidroalcoólica	3,0	6,6
<b>TOTAL</b>	-	21,0	46,4

### 3.1.2 Tratamento cromatográfico de CVHT

Uma alíquota de 13,0 g de CVHT foi adsorvido em 9,0 g de gel de sílica e submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água como eluentes. Foram feitas duas extrações com diclorometano devido à quantidade de material extraído pelo solvente obtendo um total de 6 frações denominadas CVHT-H, CVHT-D1, CVHT-D2, CVHT-Ac, CVHT-MeOH e CVHT-M/A (Tabela 3).

**Tabela 3:** Frações da coluna cromatográfica do extrato hexânico CVHT

FRAÇÃO	ELUENTE	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
CVHT-H	Hexano	0,4	3,5
CVHT-DCM-1	Diclorometano	0,6	5,0
CVHT-DCM-2	Diclorometano	4,4	34,2
CVHT-Ac	Acetato de Etila	5,0	38,4
CVHT-MeOH	Metanol	1,5	11,6
CVHT-M/A	Metanol/Água	0,1	1,1
<b>TOTAL</b>	-	12,2	94,1

### 3.1.3 Isolamento do constituinte químico CV-01

Uma alíquota de 6,0 g da fração CVET-DCM-2 foi adsorvida em 8,5 g de gel de sílica, sendo posteriormente acondicionada a uma coluna do tipo *flash* de diâmetro interno de 6,0 cm, sobre 100,0 g de gel de sílica. A eluição foi realizada utilizando hexano e acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) puros ou em misturas binárias com gradiente de eluição crescente. Foram obtidas 9 frações que após serem concentradas em rotaevaporador à pressão reduzida e analisadas por CCD resultaram nos dados descritos na Tabela 4 (pág. 28).

**Tabela 4:** Frações da coluna cromatográfica CVET-D2

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
Hexano	C36-D2A	0,07	1,17
Hexano/AcOEt 10%	C36-D2B	0,02	0,37
Hexano/AcOEt 20%	C36-D2C	0,48	8,08
Hexano/AcOEt 30%	C36-D2D	0,50	8,47
Hexano/AcOEt 50%	C36-D2E	0,55	9,17
<b>Hexano/AcOEt 75%</b>	<b>C36-D2F</b>	<b>1,22</b>	<b>20,4</b>
AcOEt	C36-D2G	0,67	11,3
AcOEt/MeOH 50%	C36-D2H	0,14	2,37
MeOH	C36-D2I	1,3	21,8
<b>TOTAL</b>	-	4,9	83,1

A fração C36-D2F (1,22 g) foi recromatografada em coluna tipo *flash* utilizando novamente um gradiente de hexano e acetato de etila (AcOEt) e por fim metanol (MeOH) obtendo 7 frações como mostra a Tabela 5.

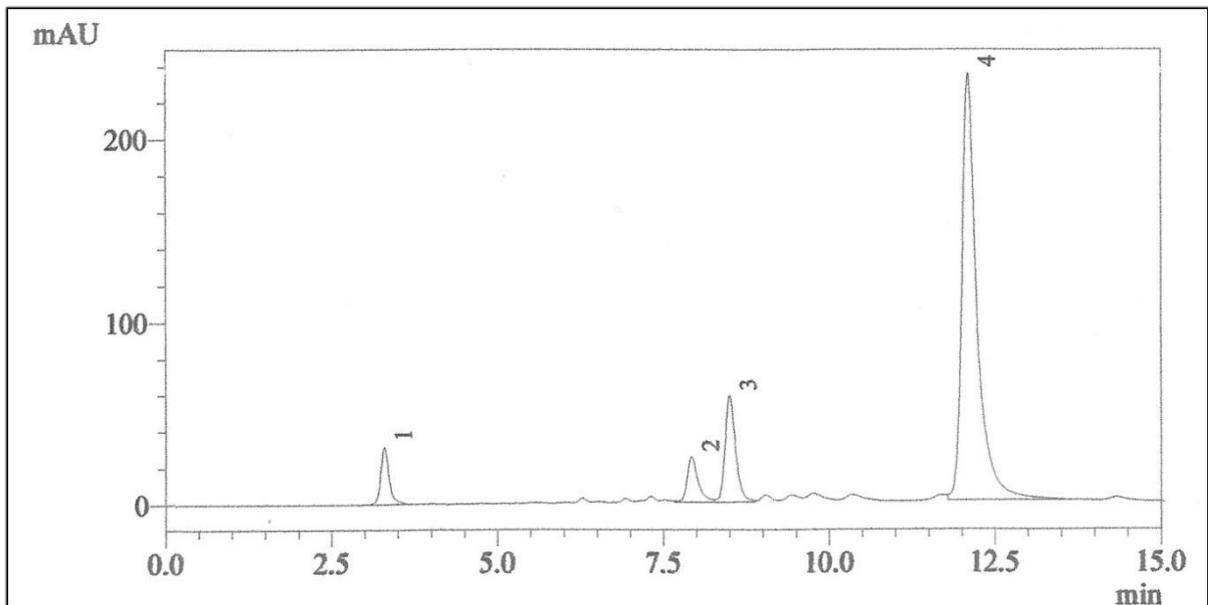
**Tabela 5:** Frações da coluna cromatográfica CVET-C36-D2F

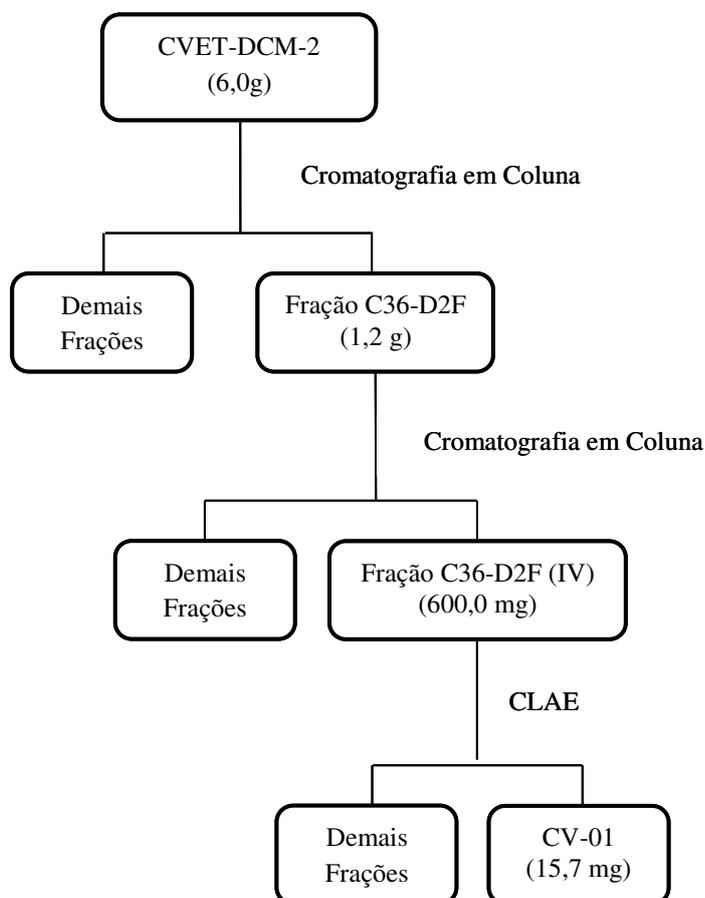
Eluente	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	C36-D2F (I)	0,004	0,3
Hexano/AcOEt 10%	C36-D2F (II)	0,094	7,6
Hexano/AcOEt 30%	C36-D2F (III)	0,075	6,1
<b>Hexano/AcOEt 50%</b>	<b>C36-D2F (IV)</b>	<b>0,6</b>	<b>49,0</b>
Hexano/AcOEt 70%	C36-D2F (V)	0,203	16,5
AcOEt	C36-D2F (VI)	0,096	7,8
MeOH	C36-D2F (VII)	0,078	6,3
<b>TOTAL</b>	-	1,15	94,9

A fração C36-D2F (IV) na análise por CCD mostrou ser interessante para análise por CLAE, optou-se então por utilizar 220,0 mg da amostra em coluna de fase normal, de eluição isocrática com mistura binária dos solventes hexano/AcOEt 60:40. O tempo de corrida

utilizado foi de 15 minutos, fluxo de 4,72mL/min, volume de injeção de 200  $\mu$ L, temperatura de 25°C e detector operando com uma faixa de detecção de 250-400nm. Foram coletados 4 picos como mostra o cromatograma (Figura 3), mas somente um pico, denominado **CV-01**, apresentou massa. O pico coletado foi identificado como um flavonóide, sua determinação estrutural se encontra disponível na página 42. O fluxograma 1 (pág 30), resume as etapas de obtenção de CV-01.

**Figura 3:** Cromatograma de CLAE de CV-01



**Fluxograma 1:** Isolamento do constiuinte CV-01

### 3.1.4 Isolamento do constituinte químico CV-02

Foi retirada uma alíquota de 4,3 g da fração CVHT-D2, obtida do extrato hexânico, e adsorvida em 6,0 g de gel de sílica sendo posteriormente acondicionada em uma coluna utilizando 44,8 g de gel de sílica. A eluição foi realizada utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol assim como a mistura binária dos mesmos. Foram obtidas 7 frações que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo e analisadas por CCD de acordo com a Tabela 6 (pág. 31).

**Tabela 6:** Frações da coluna cromatográfica da fração CVHT-D2

<b>Eluente</b>	<b>Fração</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Hexano	DCM-2.1	0,04	1,1
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50%	DCM-2.2	1,079	25,1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DCM-2.3	1,069	24,8
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 50%</b>	<b>DCM-2.4</b>	<b>1,281</b>	<b>29,8</b>
AcOEt	DCM-2.5	0,305	7,1
AcOEt/MeOH 50%	DCM-2.6	0,311	7,2
MeOH	DCM-2.7	0,044	1,0
<b>TOTAL</b>	-	4,140	96,2

A fração CVHT-DCM-2.4 foi recromatografada utilizando um gradiente de eluição com a mistura dos solventes hexano e AcOEt (10-50%) . As 10 frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por CCD de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7:** Frações da coluna cromatográfica da fração DCM-2.4

<b>Eluente</b>	<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Hexano	DCM-2.4 (A)	1,4	0,1
Hexano/AcOEt 5%	DCM-2.4 (B)	5,7	0,4
Hexano/AcOEt 10%	DCM-2.4 (C)	15,1	1,1
Hexano/AcOEt 15%	DCM-2.4 (D)	105,6	8,2
Hexano/AcOEt 20%	DCM-2.4 (E)	78,9	6,1
Hexano/AcOEt 25%	DCM-2.4 (F)	90,2	7,0
<b>Hexano/AcOEt 30%</b>	<b>DCM-2.4 (G)</b>	<b>118,1</b>	<b>9,2</b>
<b>Hexano/AcOEt 50%</b>	<b>DCM-2.4 (H)</b>	<b>158,5</b>	<b>12,3</b>
AcOEt	DCM-2.4 (I)	284,4	22,2
MeOH	DCM-2.4 (J)	123,5	9,6
<b>TOTAL</b>	-	981,3	76,4

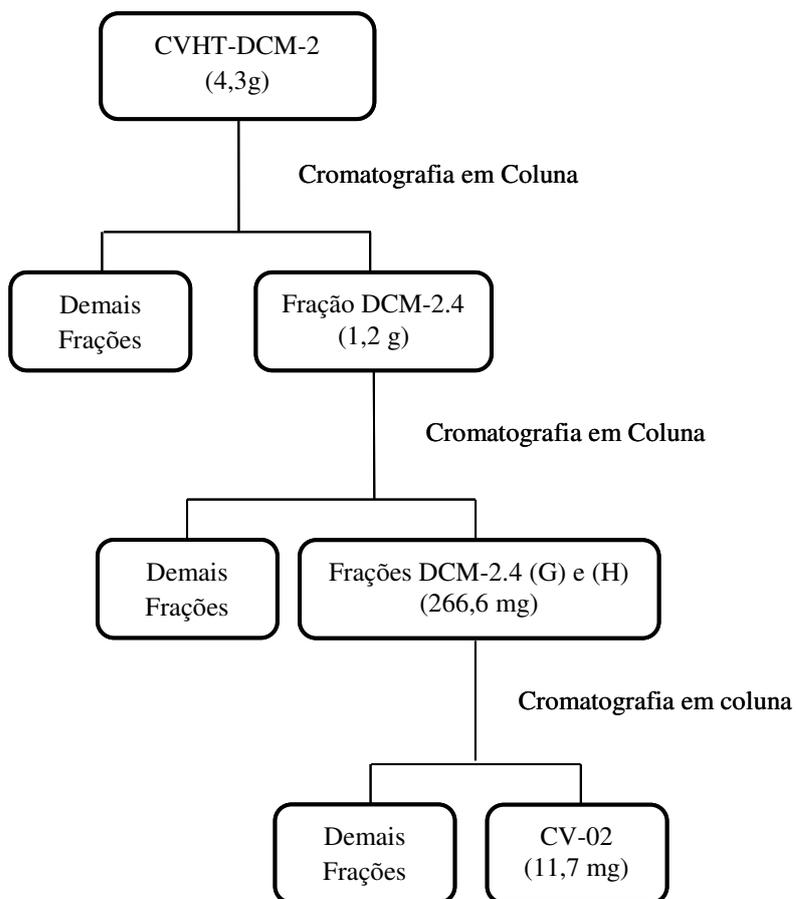
As frações DCM-2.4 (G) e DCM-2.4 (H), por se apresentarem semelhantes após análise por CCD foram reunidas e submetidas a uma coluna cromatográfica tipo *flash* sob

média pressão, utilizando 266,6 mg de material adsorvidos em 250,0 mg de sílica acondicionados em uma coluna utilizando 50,0 g de gel sílica. Foram utilizados como fase móvel os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e por metanol fim metanol puros ou como misturas binárias com gradiente de eluição crescente. Foram obtidas 145 frações que posteriormente foram reunidas após análise por CCD (Tabela 8).

**Tabela 8:** Frações da coluna cromatográfica de DCM-2.4 (G) e DCM-2.4 (H)

Eluente	Fração	Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
Hexano	DCM-2.4 G.H-1	-	1,2	0,4
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 5%	DCM-2.4 G.H-2	1 – 9	4,8	1,8
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10%	DCM-2.4 G.H-3	10 – 31	3,4	1,2
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 15%	DCM-2.4 G.H-4	32 – 46	0,9	0,3
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20%	DCM-2.4 G.H-5	47 – 58	0,4	0,1
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30%	DCM-2.4 G.H-6	59 – 76	7,3	2,7
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50%	DCM-2.4 G.H-7	77 – 84	3,5	1,3
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70%	DCM-2.4 G.H-8	85 – 98	13,8	5,1
Hexano/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90%	DCM-2.4 G.H-9	99 – 111	17,8	6,6
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<b>DCM-2.4G.H-10</b>	<b>112 – 120</b>	<b>11,7</b>	<b>4,3</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 5%	DCM-2.4G.H-11	121 – 129	48,0	18,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 50%	DCM-2.4G.H-12	130 – 136	130,0	48,7
AcOEt	DCM-2.4G.H-13	137 – 139	0,9	0,3
MeOH	DCM-2.4G.H-14	140 - 145	14,5	5,2
<b>TOTAL</b>	-	-	<b>257,7</b>	<b>96,6</b>

A fração DCM-2.4 G.H 10 se mostrou homogênea após análise de CCD, resultando em 11,7 mg de um sólido amarelado denominado de CV-02 se tratando de um flavonóide. A determinação estrutural de CV-02 encontra-se na página 52. O fluxograma 2 (pág 33) mostra as etapas de obtenção de CV-02.

**Fluxograma 2:** Isolamento do constituinte CV-02

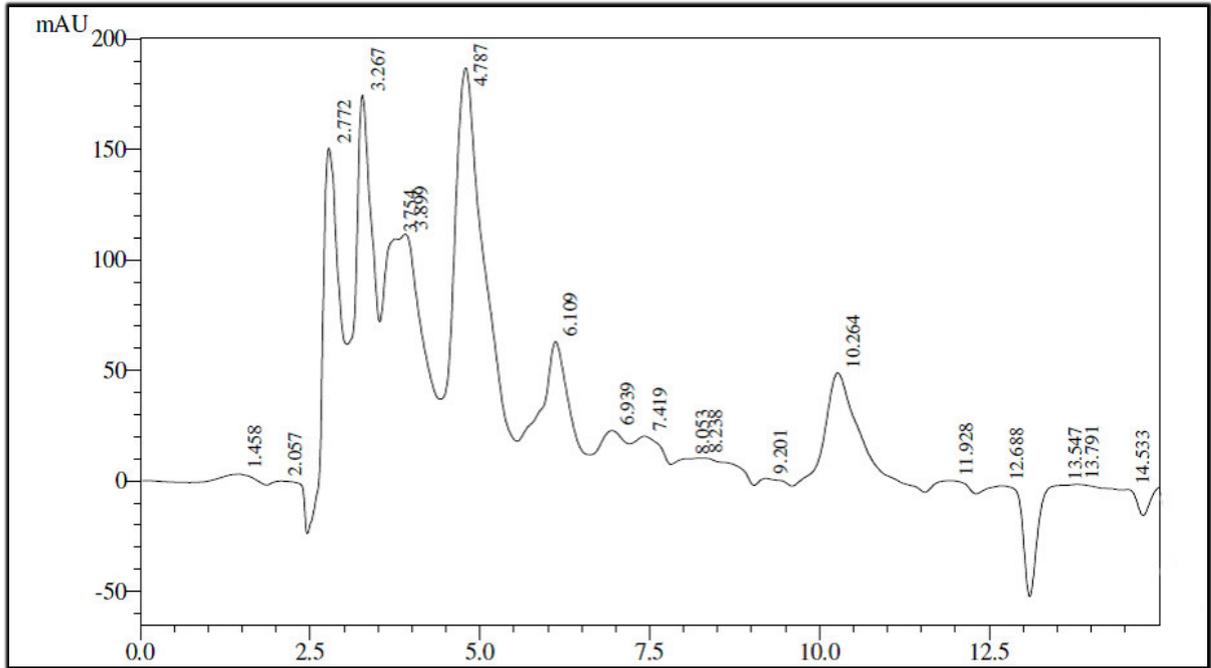
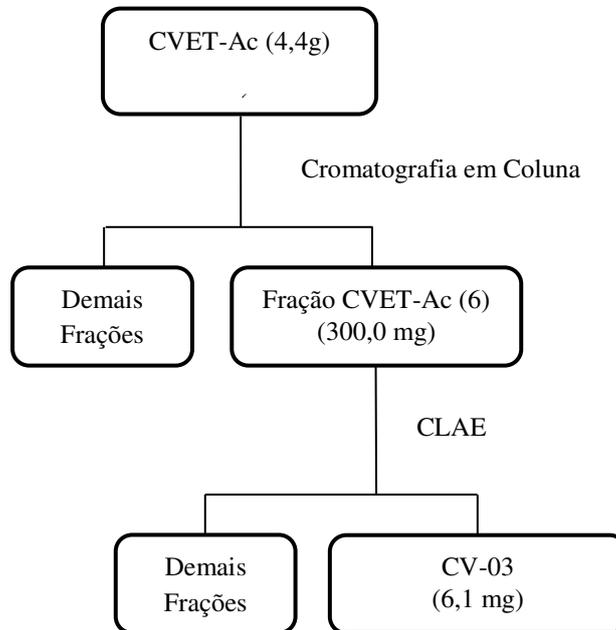
### 3.1.5 Isolamento do constituinte químico CV-03

Uma alíquota de 3,4 g de CVET-Ac oriunda do extrato etanólico, foi adsorvida em gel de sílica e submetida a uma coluna cromatográfica tipo *flash* sob média pressão, sobre 70,0 g de gel de sílica. Como fase móvel, foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias com gradiente de eluição crescente. Foram obtidas 9 frações como mostra a Tabela 9 (pág 34).

**Tabela 9:** Frações da coluna cromatográfica de CVET-Ac

<b>Eluente</b>	<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Hexano	CVET-Ac (1)	1,70	0,06
Hexano/ AcOEt 25%	CVET-Ac (2)	430,0	14,33
Hexano/ AcOEt 50%	CVET-Ac (3)	153,0	5,10
Hexano/ AcOEt 75%	CVET-Ac (4)	140,0	4,67
AcOEt	CVET-Ac (5)	500,0	16,67
<b>AcOEt/MeOH 25%</b>	<b>CVET-Ac (6)</b>	<b>300,0</b>	<b>10,00</b>
AcOEt/MeOH 50%	CVET-Ac (7)	1250,0	41,67
AcOEt/MeOH 75%	CVET-Ac (8)	44,9	1,47
MeOH	CVET-Ac (9)	58,4	1,93
<b>TOTAL</b>	-	2876,7	95,89

A fração CVET-Ac (6) foi submetida a uma cromatografia em CLAE utilizando 250,0 mg da amostra em coluna de fase reversa, eluída com uma mistura binária de solventes Metanol/H<sub>2</sub>O 65:35 (v:v) como modo isocrático, com um tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 4,72 mL/min, volume de injeção de 200 µL, temperatura de 30°C e detector operando com uma faixa de detecção de 210-400 nm. Foram coletados 5 picos como mostra o cromatograma (Figura 4, pág 35) mas somente um pico, denominado CV-03, apresentou massa. O pico coletado foi identificado como um sesquiterpeno, sua determinação estrutural se encontra disponível na página 59. O fluxograma 3, (pág 35), mostra as etapas de obtenção de CV-03

**Figura 4:** Cromatograma de CLAE de CV-03**Fluxograma 3:** Isolamento do constituinte CV-03

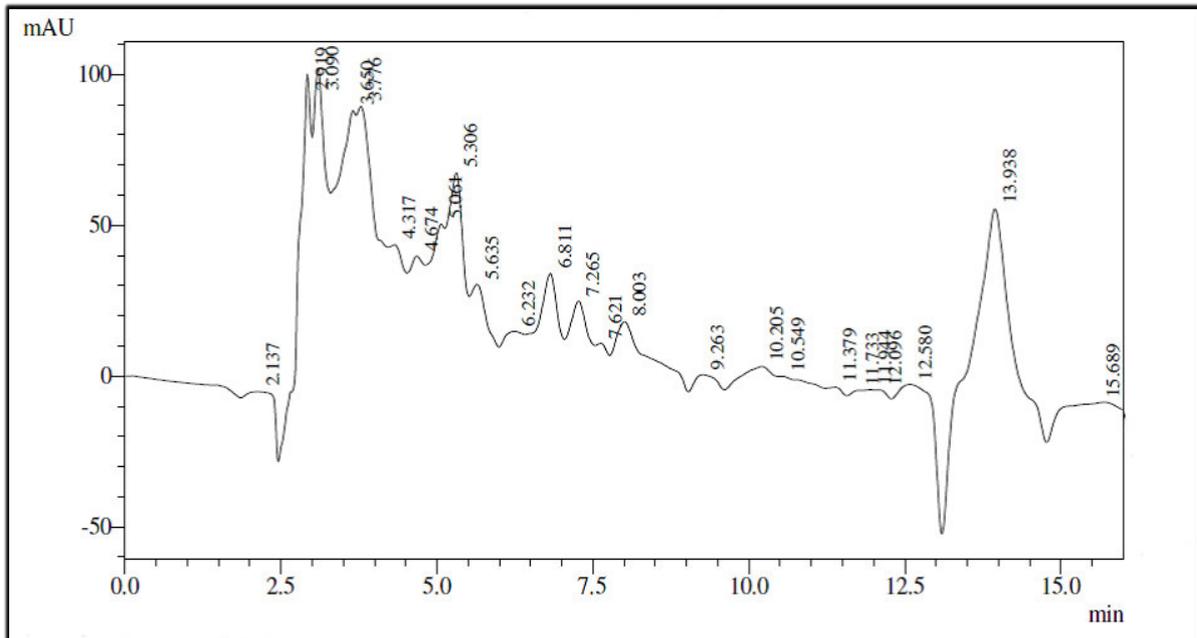
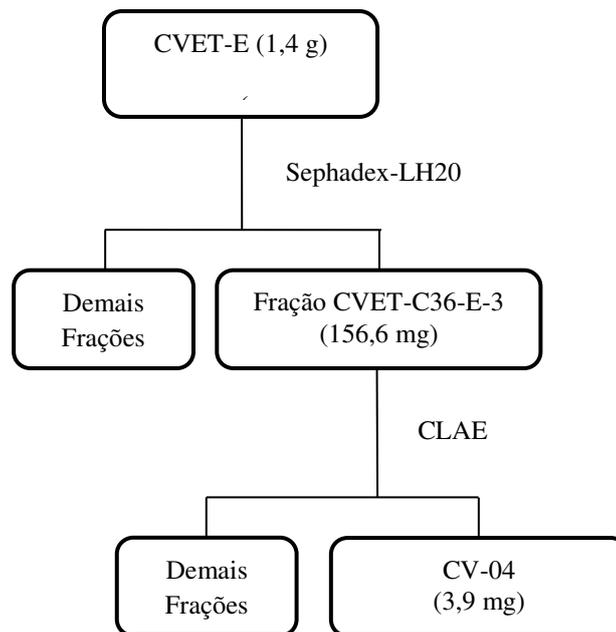
### 3.1.6 Isolamento do constituinte químico CV-04

A amostra CVET-E, originada do extrato etanólico dos talos *Croton velutinus* forneceu 1,4 g. Foram retirados 900,0 mg da amostra e submetida a uma coluna de gel de dextrana Sephadex-LH20, utilizando metanol como fase móvel. Foram coletadas 49 frações e reunidas de acordo com análise por CCD (Tabela 10).

**Tabela 10:** Frações da coluna Sephadex-LH20 de CVET-E

Amostras	Frações reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
CVET-E-1	1 – 11	269,1	29,9
CVET-E-2	12 – 15	204,6	22,7
<b>CVET-E-3</b>	<b>16 – 22</b>	<b>156,6</b>	<b>17,4</b>
CVET-E-4	23 – 30	139,9	15,5
CVET-E-5	31 – 41	110,5	12,3
CVET-E-6	42 - 49	5,9	0,7
-	-	886,6	98,5

A fração CVET-E-3 após análise por CCD foi selecionada para análise em CLAE, utilizando 156,0 mg da amostra em coluna de fase reversa, eluída com uma mistura binária de solventes Metanol/H<sub>2</sub>O 70:30 como modo isocrático, com um tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 4,72mL/min, volume de injeção de 200 µL, temperatura de 30°C e detector operando com uma faixa de detecção de 210-400nm. Foram coletados 5 picos como mostra o cromatograma (Figura 5, pág 37), mas somente um pico, denominado **CV-04**, apresentou massa. O pico coletado foi identificado como um sesquiterpeno, sua determinação estrutural se encontra disponível na página 70. O fluxograma 4 (pág 37), mostra as etapas de obtenção de CV-04.

**Figura 5:** Cromatograma de CLAE de CV-04**Fluxograma 4:** Isolamento do constituinte CV-04

### 3.1.7 Isolamento do constituinte químico CV-05

A amostra CVET-DCM-1 originada do extrato etanólico dos talos de *Croton velutinus*, forneceu 1,4 g. Foram retirados 550,0 mg da amostra e adsorvida em 1,0 g de gel de sílica, e submetida a uma coluna cromatográfica tipo *flash* utilizando 30,0 g de gel de sílica. A fase móvel foi constituída dos solventes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas

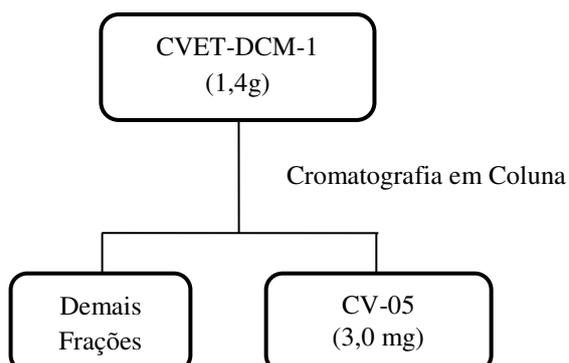
binárias com gradiente de eluição crescente. Foram obtidas 111 frações, sendo posteriormente reunidas mediante análise por CCD (Tabela 11).

**Tabela 11:** Frações da coluna cromatográfica de CVET-DCM-1

Eluente	Amostra	Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
Hexano	D1-A	-	1 – 7	10,0	1,82
Hexano/AcOEt 5%	D1-B	1 – 10	8 – 11	52,3	9,51
Hexano/AcOEt 10%	D1-C	11 – 23	12 – 19	4,0	0,73
Hexano/AcOEt 15%	D1-D	24 – 35	20 – 35	8,0	1,45
Hexano/AcOEt 20%	D1-E	36 – 48	36 – 38	1,9	0,35
Hexano/AcOEt 40%	D1-F	49 – 60	39 – 41	17,9	3,25
Hexano/AcOEt 60%	D1-G	61 – 78	42 – 49	14,9	2,71
Hexano/AcOEt 80%	D1-H	79 – 84	50 – 59	19,8	3,60
AcOEt	D1-I	95 – 100	60 – 76	60,2	10,95
MeOH	D1-J	101 - 111	77 – 82	66,1	12,02
-	<b>D1-K</b>	-	<b>81</b>	<b>3,0</b>	<b>0,55</b>
-	D1-L	-	83 – 87	63,2	11,49
-	D1-M	-	88 – 97	93,9	17,07
-	D1-N	-	98 – 102	43,7	7,95
-	D1-O	-	103 – 111	31,9	5,80
<b>TOTAL</b>	-	-	-	490,8	89,24

A fração D1-K se mostrou homogênea após análise em CCD, resultando e 3,0 mg de uma resina amarelada denominada de CV-05 se tratando de um diterpeno clerodano. A determinação estrutural de CV-05 se encontra na página 80. O fluxograma 5 mostra as etapas de obtenção de CV-05.

**Fluxograma 5:** Isolamento do constituinte CV-05



## 3.2 Métodos Cromatográficos

### 3.2.1 Cromatografia de Adsorção

As cromatografias de adsorção foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 ( $\Phi$  63-200  $\mu\text{m}$ ) da Merck para cromatografia líquida em coluna e gel de sílica 60 ( $\Phi$  40-63  $\mu\text{m}$ ) da Merck para cromatografia sob média pressão (cromatografia *flash*), empregando-se uma bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos LTDA. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de sílica a serem utilizadas. Para eluição foram utilizados os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol assim como misturas binárias desses solventes em ordem crescente de polaridade. Todos os solventes eram qualidades P.A ou destilados.

### 3.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 ( $\Phi$   $\mu\text{m}$  2 – 5  $\mu\text{m}$ ) sobre alumínio da NIGEL (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). A revelação das substâncias foi feita por exposição à irradiação na faixa do ultravioleta (UV) em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F, com dois comprimentos de onda (365 e 312 nm) e por aspersion com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) e etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), seguida de aquecimento em chapa elétrica a 100°C por aproximadamente 5 minutos.

### 3.2.3 Cromatografia de Exclusão

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão (peneira molecular) foram efetuados em gel formado pelo derivado hidroxipropil de dextrana (Sephadex LH-20) na Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol como fase móvel.

### 3.2.4 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de dióxido (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram efetuadas em coluna semi preparativa Phenomenex® (4,6 x 250 nm, 5  $\mu\text{m}$ ), mantidas em forno termostático a 30°C. As amostras foram eluídas em fase normal com hexano e acetato de etila e na fase reversa (C-18) com água, metanol e acetonitrila.

Os solventes grau HPLC utilizados foram Hexano e acetato de etila (Panreac) para fase normal e metanol (Vetec), Acetonitrila, - (Panreac) e água Milli-Q para fase reversa, tais solventes foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas em membranas de PTFE (Politetrafluoretileno) com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ . $\mu\text{m}$  (Whatman).

### **3.3 Métodos Espectroscópicos**

#### ***3.3.1 Espectroscopia da região do infravermelho***

Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer modelo FT-IR Spectrum 1000 no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR-UFC) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará

#### ***3.3.2 Espectrometria de Massas (EM)***

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro SHIMADZU, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC), sendo os *scans* adquiridos no modo positivo. Os espectros de CG-EM foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu modelo QP5050, por impacto eletrônico a 70 eV, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

#### ***3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)***

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais, foram obtidos à temperatura ambiente, em espectrômetros BRUKER, modelos Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e 499,80 MHz, e na frequência do carbono a 75,47 MHz e 125,67 MHz, respectivamente.

Os espectros unidimensionais de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB foram efetuados sob desacoplamento total de hidrogênios. Quantidades variadas de amostra foram dissolvidas em 0,6 mL de  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  e  $\text{D}_2\text{O}$  e acondicionadas em tubos de RMN de 5 mm. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para o RMN  $^1\text{H}$

pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solventes  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,27 ppm) e  $\text{DMSO-d}_6$  ( $\delta_{\text{H}}$  2,50 ppm). Para RMN  $^{13}\text{C}$  foi utilizado o pico central do tripleto a ( $\delta_{\text{C}}$  77,23 ppm) do  $\text{CDCl}_3$  e do septeto ( $\delta_{\text{C}}$  39,5 ppm) para o  $\text{DMSO-d}_6$ .

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplete de duplete), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$  foi determinado a partir da utilização da técnica DEPT, variando o ângulo de nutação ( $\theta$ ) de  $135^\circ$ , descrito segundo a convenção: (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela comparação dos espectros DEPT  $135^\circ$  e do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -BB.

Experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY), heteronuclear (HSQC e HMBC) e (DOSY) foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se z-gradiente de campo de magnitude de 10A.

## 4.0 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 4.1 Determinação Estrutural de CV-01

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração CVET-Ac originária do extrato etanólico dos talos de *C. velutinus* utilizando gel de sílica e CLAE, resultou no isolamento de 15,7 mg de um sólido amarelado codificado como CV-01 (Item 3.1.3, pág 27).

O espectro na região do infravermelho de CV-01 (Figura 8, pág 47) apresentou uma banda larga em  $3450\text{ cm}^{-1}$  podendo se tratar de uma deformação axial de ligação O-H, uma banda em  $2936\text{ cm}^{-1}$  característica de uma deformação axial de C-H de carbono  $\text{sp}^3$ , uma banda em  $1655\text{ cm}^{-1}$  podendo se tratar de uma carbonila conjugada, bandas referentes a ligações  $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$  em  $1592\text{ cm}^{-1}$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$  e bandas em  $1269\text{ cm}^{-1}$  e  $1218\text{ cm}^{-1}$  características de deformação axial de ligação C-O.

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Figura 10, pág. 48) revelou a presença de 11 sinais relativos a carbonos não hidrogenados (C), 4 carbonos monoidrogenados (CH) e 4 carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Figura 9, pág 48) apresentou 19 linhas espectrais, dentre estas, uma em  $\delta_{\text{C}} 179,20$  correspondente a uma carbonila, 14 linhas na faixa de  $\delta_{\text{C}} 90,58 - 159,03$  podendo ser atribuídas a carbonos insaturados os quais 8 foram atribuídos a carbonos oxigenados, sendo eles  $\delta_{\text{C}} 132,54, 139,26, 145,80, 149,0, 152,56, 152,97, 155,84$  e  $159,03$  e 4 linhas características de grupos metoxilas  $\delta_{\text{C}} 56,28, 56,53, 60,36, 61,08$ .

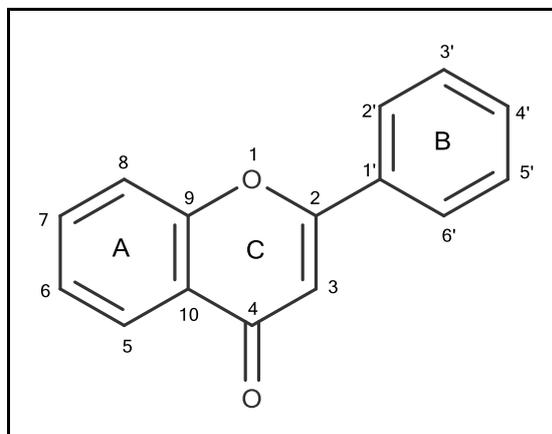
A partir da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Figura 11 pág. 49) foram observados sinais na região característica de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{H}} 7,73$  (dd,  $J = 8,6\text{ Hz}; J = 2,1\text{ Hz}$ , H-6'),  $\delta_{\text{H}} 7,68$  (d,  $J = 2,1\text{ Hz}$ , H-2'),  $\delta_{\text{H}} 6,98$  (d,  $J = 8,6\text{ Hz}$ , H-5') e  $\delta_{\text{H}} 6,51$  (s, H-8), além de quatro sinais intensos em  $\delta_{\text{H}} 3,99, \delta_{\text{H}} 3,96, \delta_{\text{H}} 3,92$  e  $\delta_{\text{H}} 3,87$  sendo todos simpletos com integração para 3 hidrogênios cada, se tratando então de quatro metoxilas, é possível observar ainda um sinal em  $\delta_{\text{H}} 12,64$  podendo se tratar de uma hidroxila quelada.

O diagrama de contorno do espectro de HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figuras 12 e 13, páginas 49 e 50) possibilitou observar o acoplamento C-H à uma ligação, relacionando os hidrogênios a seus respectivos carbonos.

De acordo com os dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$ , apresentando um índice de deficiência de hidrogênio – IDH de 11

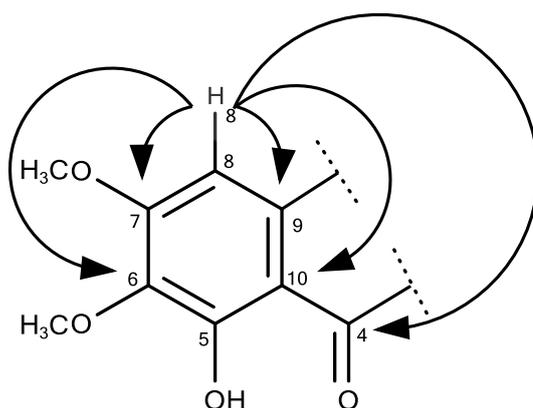
lacunas. CV-01 foi relacionado a um flavonoide do tipo flavona, com a estrutura básica de 15 carbonos (Figura 6).

**Figura 6:** Estrutura básica de uma flavona



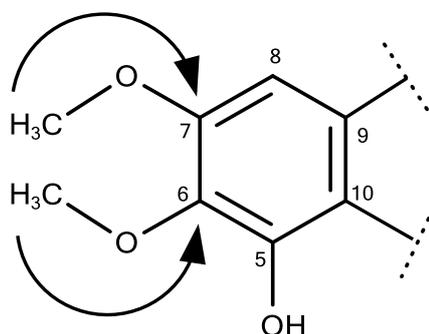
O padrão de substituição nos anéis A e B foi proposto a partir da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As posições dos substituintes no anel “A” foram propostas nos carbonos 5 e 8, devido a presença de uma hidroxila quelada em  $\delta_{\text{H}}$  12,64 no carbono 5 e de um hidrogênio sinpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,51 no carbono 8 evidenciado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11, pág 49).

O espectro de correlação heteronuclear a duas ou mais ligações ( $^nJ$ ) HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Figura 14, pág 50) mostrou as correlações dos hidrogênios com os carbonos a duas ( $^2J$ ), três ( $^3J$ ) e quatro ( $^4J$ ) ligações. Dessa forma, foi possível assinalar sem equívocos os deslocamentos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e comprovar a posição do hidrogênio no carbono em  $\delta_{\text{C}}$  90,43 (C-8) onde se observa uma correlação favorecido pela conformação em “W”, a quatro ligações ( $^4J$ ), com o carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  179,20 (C-4), além de quatro outras correlações, uma com um carbono não hidrogenado em  $\delta_{\text{C}}$  106,70 (C-10), e outras três correlações com carbonos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  132,39 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  152,4 (C-9) e  $\delta_{\text{C}}$  158,87 (C-7) como mostra a subestrutura 1.



Subestrutura 1

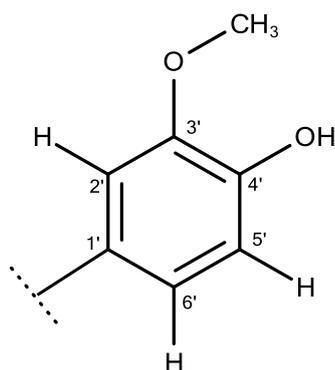
As metoxilas no anel “A” podem ser justificadas também pelo espectro de HMBC (Figura 15, pág 51) onde se observa as correlações dos hidrogênios da metila com os carbonos do anel a três ligações ( $^3J$ ). A metoxila em  $\delta_H$  3,92 com o carbono em  $\delta_C$  132,39 (C-6) e a metoxila em  $\delta_H$  3,96 com o carbono em  $\delta_C$  158,87 (C-7) de acordo com a subestrutura 2.



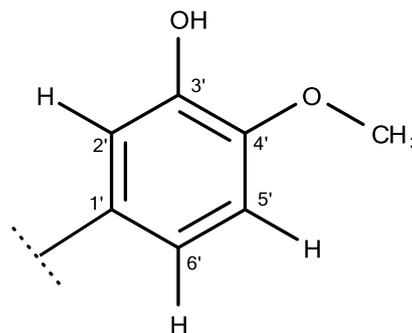
Subestrutura 2

De acordo com os dados obtidos, pode - se propor duas possibilidades para o posicionamento dos substituintes no anel “B” de forma a montar um sistema ABX:

- (a) A metoxila na posição C-3’ e uma hidroxila na posição C-4’;
- (b) A metoxila na posição C-4’ e uma hidroxila na posição C-3’.



Subestrutura 3a

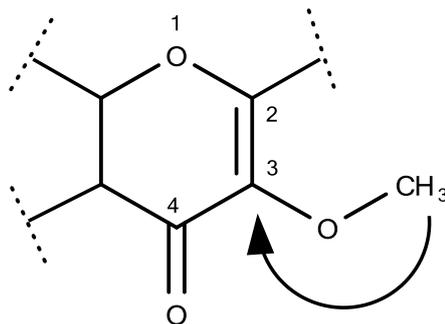


Subestrutura 3b

A subestrutura (3a) não pode ser relacionado ao sistema ABX de CV-01, uma vez que o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 (dd,  $J = 8,6$  Hz;  $J = 2,1$  Hz, H-6') correlaciona no espectro de HMBC com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  148,86, onde o mesmo apresenta correlação com os hidrogênios de uma metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,99, sendo portanto um carbono ligado a uma metoxila, no entanto essa correlação do hidrogênio (H-6') com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  148,86 não é possível no fragmento (a). A subestrutura (3b) é o fragmento mais provável para o anel "B", justificando dessa forma as correlações observadas no espectro de HMBC e a multiplicidade dos sinais de hidrogênio assim como os deslocamentos químicos no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

A posição das duas hidroxilas na estrutura de CV-01 foram propostas a partir do deslocamento químico dos carbonos a ela ligados. Uma das hidroxilas foi posicionada no carbono (C-5) por estar quelada e a outra foi posicionada no carbono (C-3') devido ao deslocamento químico desse sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  145,66.

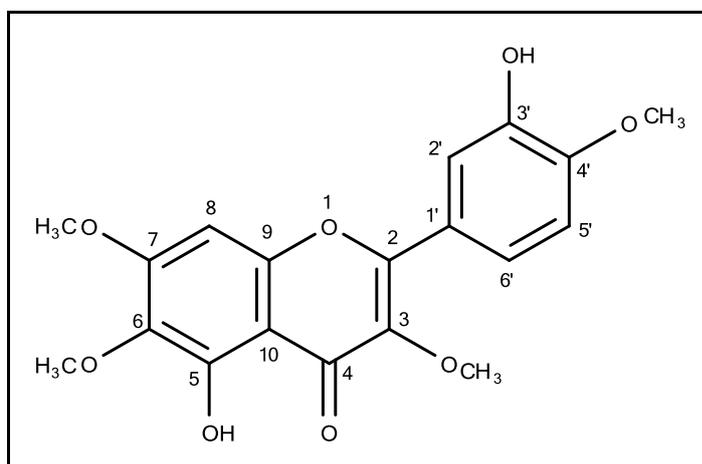
No anel "C", o deslocamento químico do carbono (C-3) em  $\delta_{\text{C}}$  139,10, podendo ser um carbono oxigenado, se deve a presença de uma metoxila ligada ao mesmo. Segundo Agrawal, (1989) nas 3-metoxiflavonas, o carbono (C-3) apresenta deslocamento químico entre  $\delta_{\text{C}}$  133-160. A subestrutura (4) mostra a correlação existente no espectro HMBC (Figura 14, pág 50) entre os hidrogênios da metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  3,92 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  139,10.



Subestrutura 4

Os dados discutidos anteriormente permitiram sugerir a estrutura de uma tetrametoxiflavona diidroxilada. A comparação com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CV-01 com os dados descritos na literatura (BROWN, LIANG e SY, 2003) (Tabela 12, pág 47) permitiram caracterizar o composto como 5, 3'-diidroxil-3, 6, 7, 4'-tetrametoxiflavona, também conhecida como Casticina (Figura 7), substância a qual já isolada anteriormente nas espécies *Croton brasilienses*, *Croton sellowii* (JÚNIOR, *et al.*, 2005, 2006) e *Croton betulaster* (SPOHR, *et al.*, 2010), mas inédito na espécie *Croton velutinus*.

Figura 7: Casticina

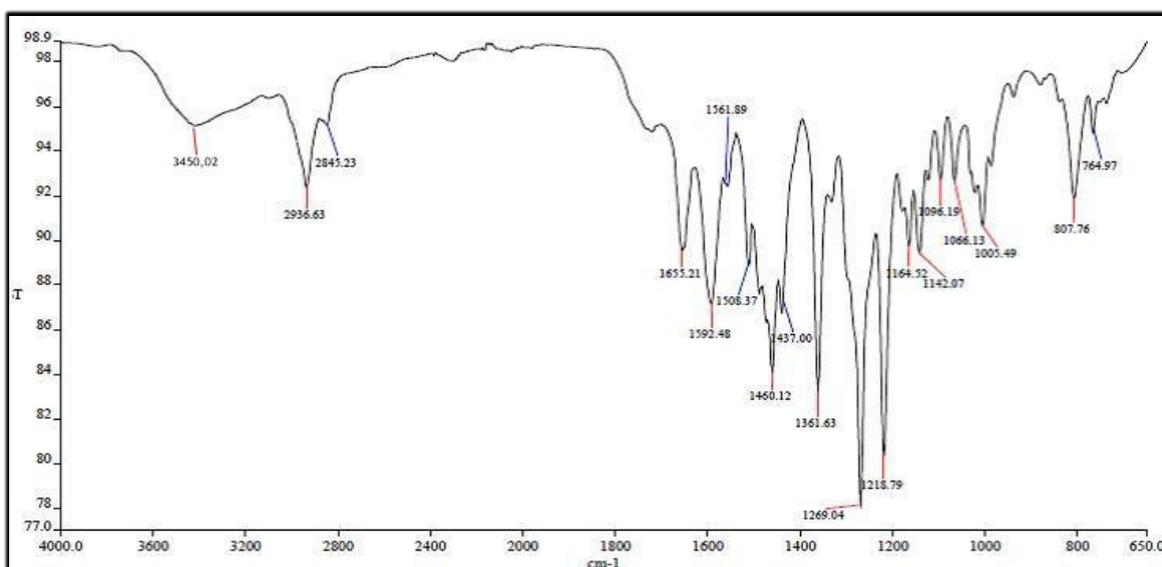


**Tabela 12:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações de HSQC e HMBC ( $^2J$  e  $^3J$ ) ( $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01, comparado com valores da literatura de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

C	HSQC		HMBC			CASTICINA*	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$^2J$	$^3J$	$^4J$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
2	155,8	-	-	-	-	155,7	-
3	139,2	-	-	3-OMe	-	139,0	-
4	179,2	-	-	-	H-8	179,0	-
5	152,9	-	-	-	-	152,7	-
6	132,5	-	-	H-8; 6-OMe	-	132,3	-
7	159,0	-	H-8	7-OMe	-	158,8	-
8	90,5	6,51 (s, 1H)	-	-	-	90,4	6,51 (s, 1H)
9	152,5	-	H-8	-	-	152,4	-
10	106,8	-	-	H-8	-	106,6	-
1'	123,9	-	-	H-5'	-	123,6	-
2'	114,5	7,68 (d, 1H, 2,1 Hz)	-	H-6'	-	114,4	7,68 (d, 1H, 2,3 Hz)
3'	145,8	-	-	H-5'	-	145,6	-
4'	149,0	-	H-5'	H-6'; 4'-OMe	-	148,8	-
5'	110,6	6,98 (d, 1H, 8,6 Hz)	-	-	-	110,4	6,98 (d, 1H, 8,7 Hz)
6'	121,8	7,73 (dd, 1H, 8,6 Hz; 2,1 Hz)	-	H-2'	-	121,6	7,73 (dd, 1H, 8,7 Hz; 2,3 Hz)
3-OMe	60,3	3,87 (s; 3H)	-	-	-	60,2	3,87 (s; 3H)
6-OMe	61,0	3,92 (s; 3H)	-	-	-	60,9	3,93 (s; 3H)
7-OMe	56,5	3,96 (s; 3H)	-	-	-	56,3	3,96 (s; 3H)
4'-OMe	56,2	3,99 (s; 3H)	-	-	-	56,1	3,99 (s; 3H)
5-OH	-	12,64 (s, 1H)	-	-	-	-	12,59 (s, 1H)

\*Dados obtidos de (BROWN, LIANG, & SAY, 2003).

**Figura 8:** Espectro de absorção no infravermelho de CV-01



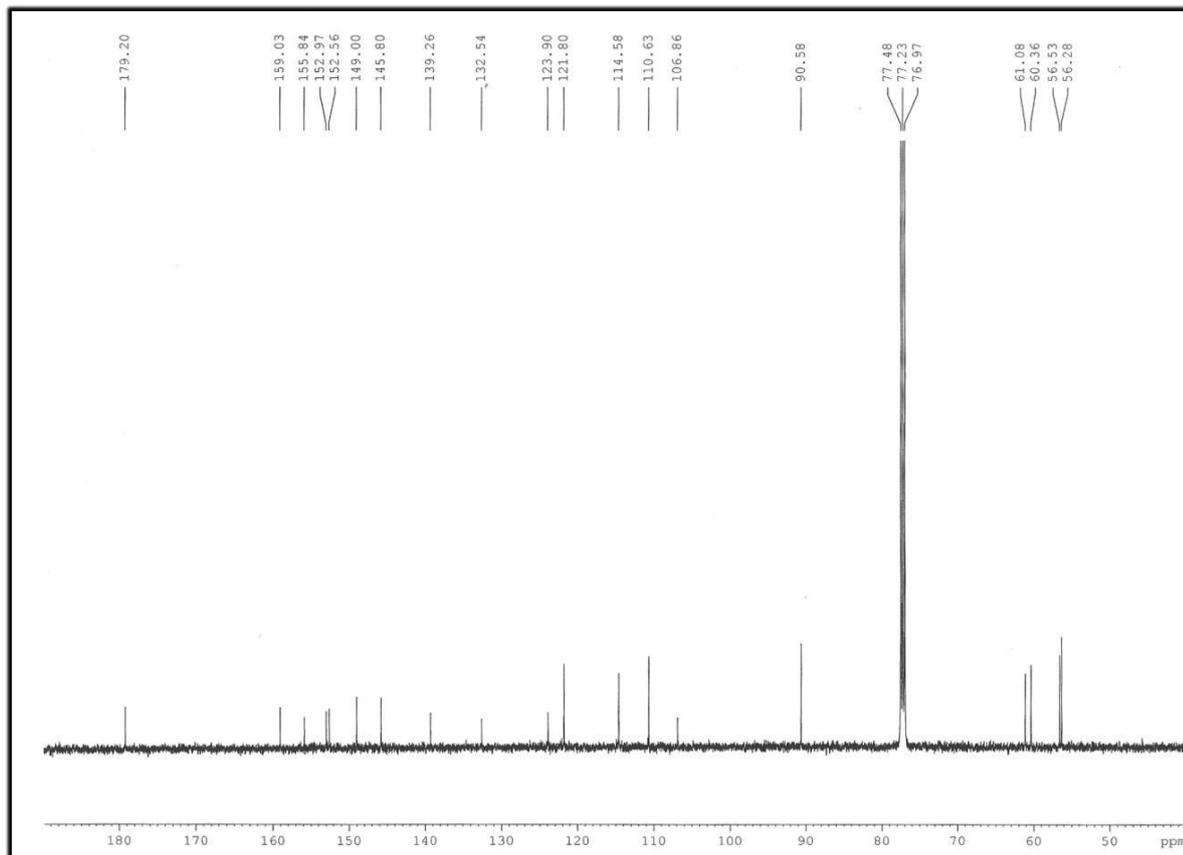
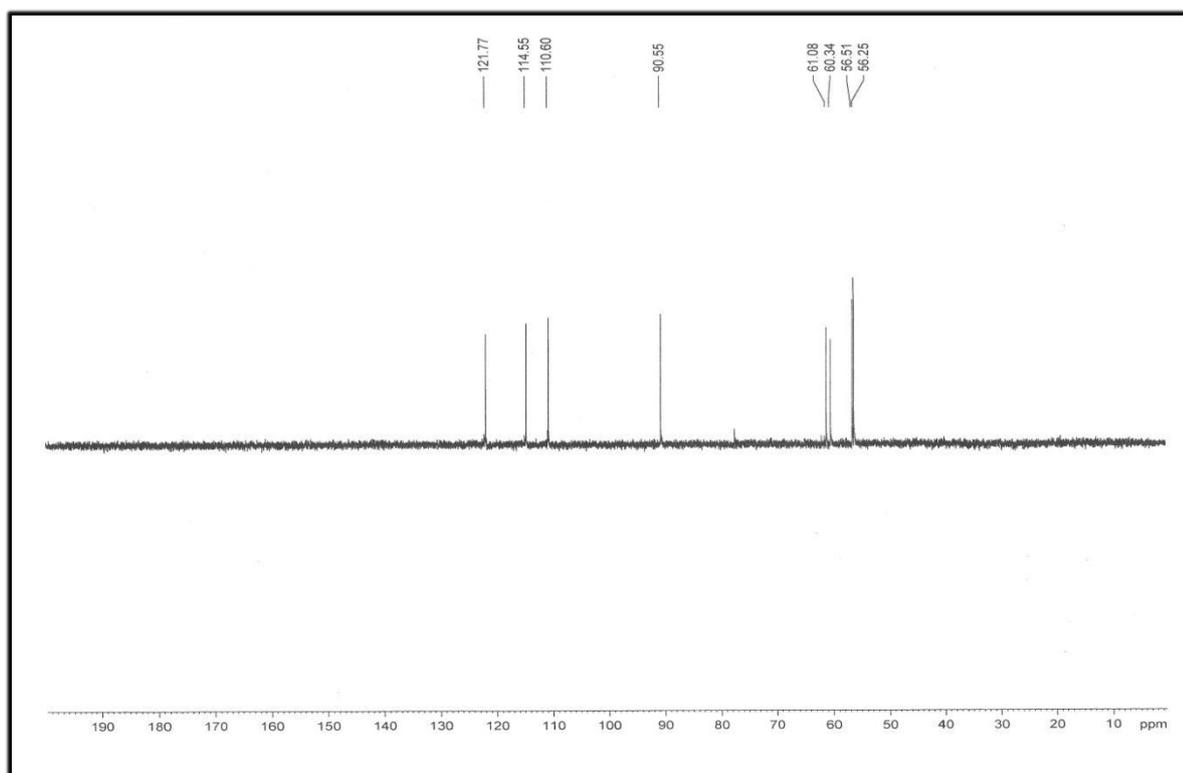
**Figura 9:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01**Figura 10:** Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01

Figura 11: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01

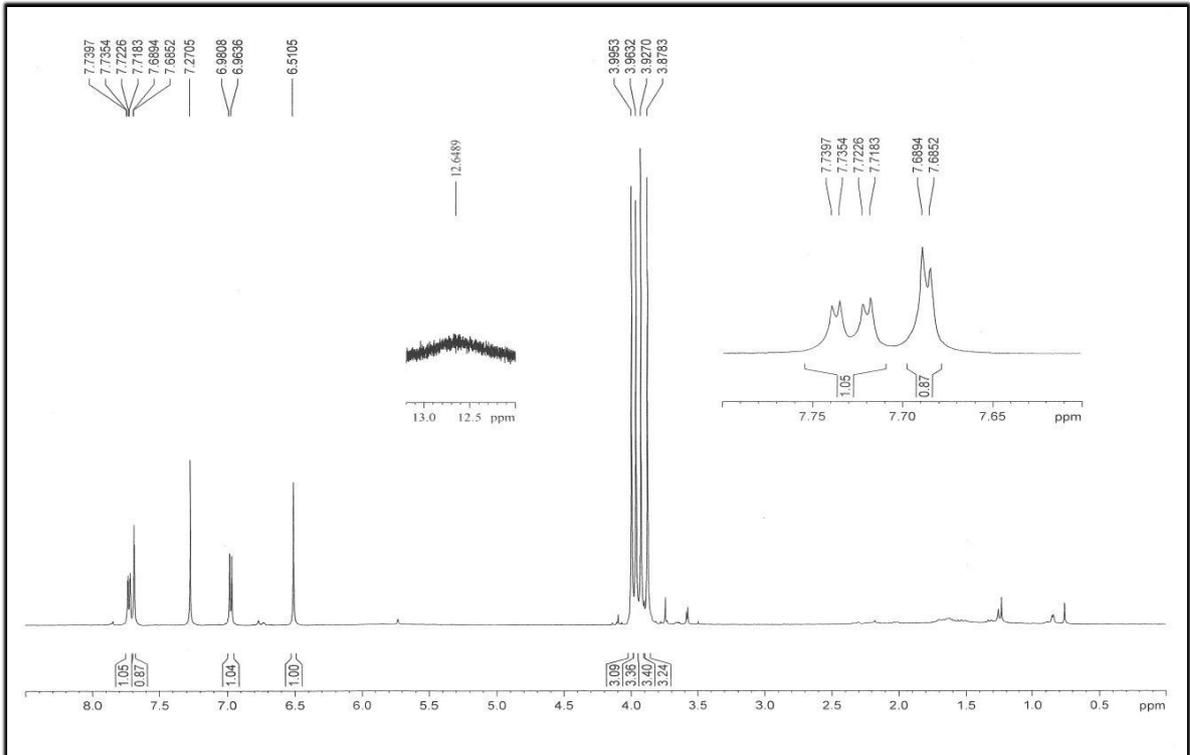
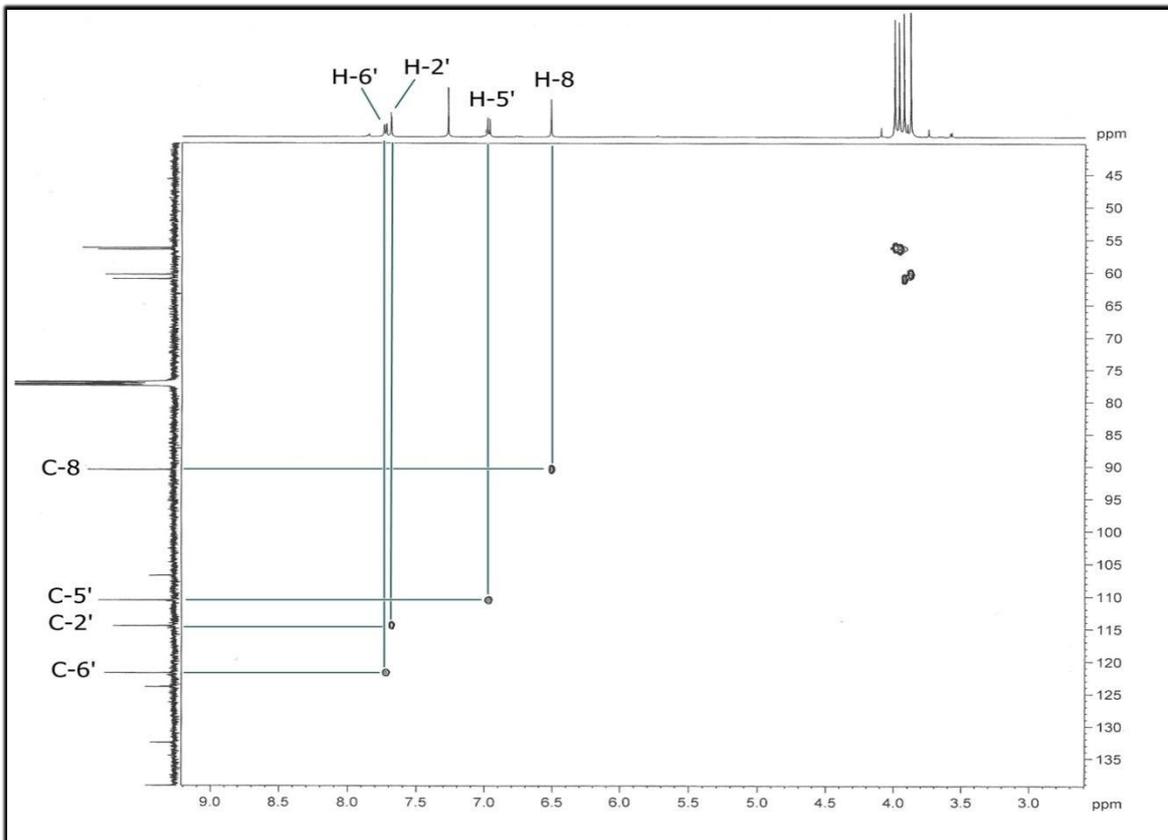
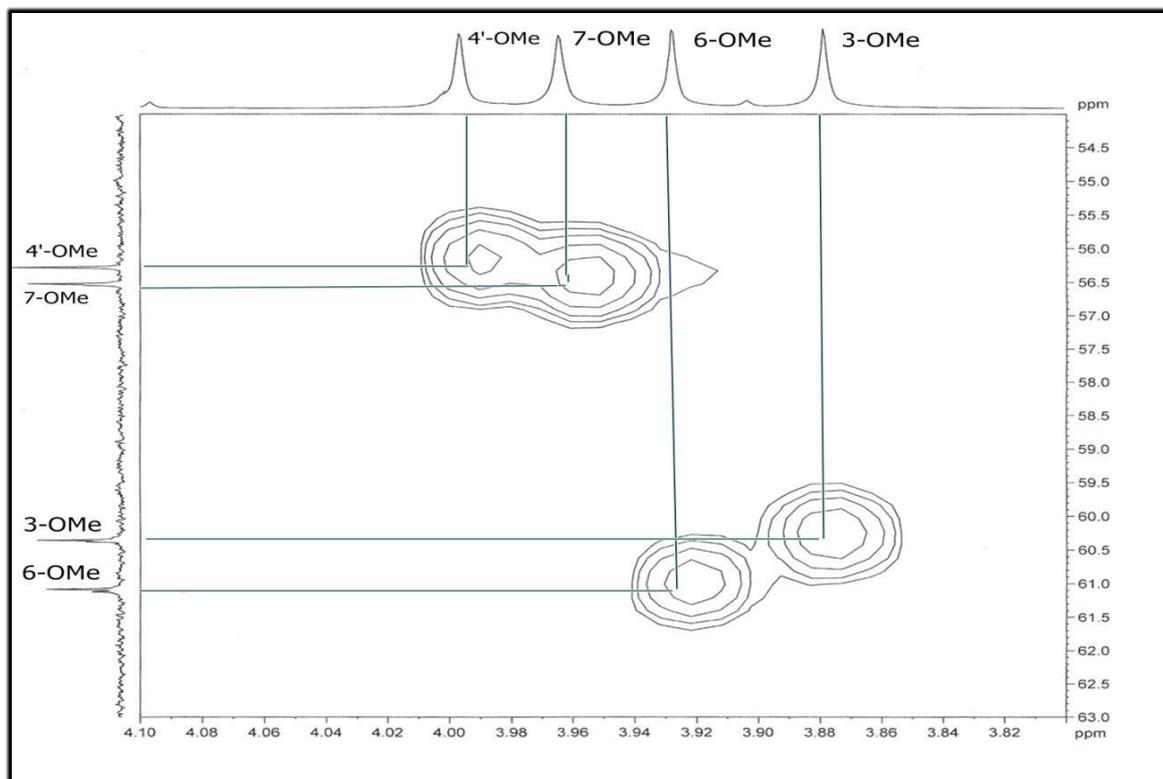


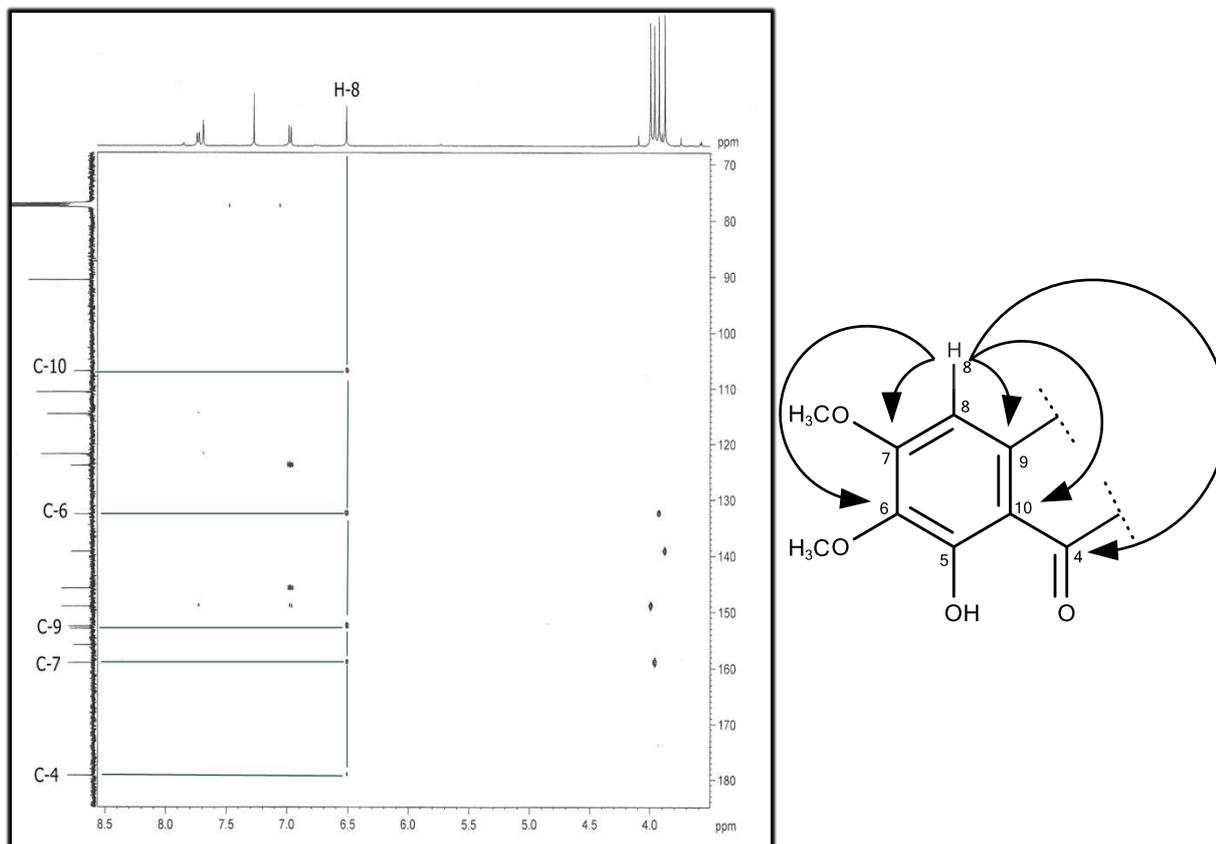
Figura 12: Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01



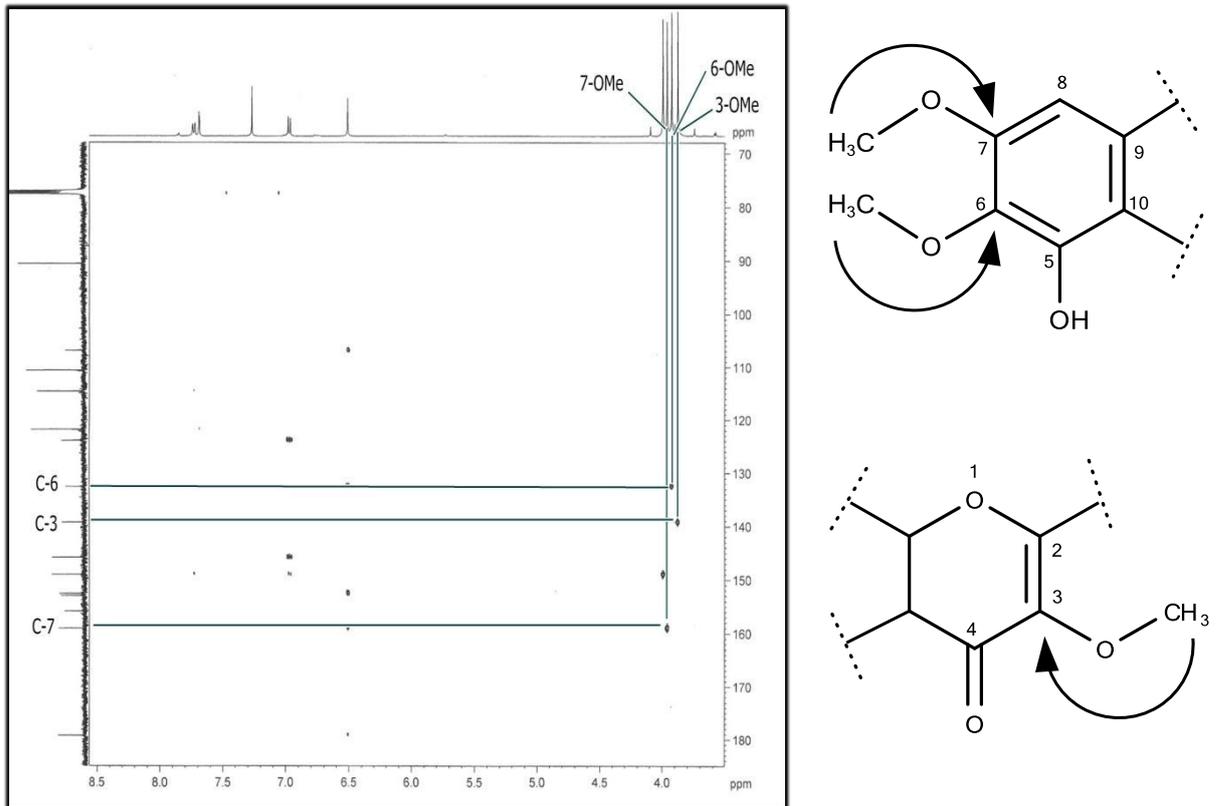
**Figura 13:** Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Expansão)



**Figura 14:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01



**Figura 15:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-01 (Expansão)



## 4.2 Determinação Estrutural de CV-02

O fracionamento cromatográfico da fração CVHT-DCM-2 obtida do extrato hexânico dos talos de *Croton velutinus* utilizando gel de sílica, forneceu 11,7 mg de um sólido amarelado denominado de CV-02 (Item 3.1.4, pág 30).

O espectro na região do infravermelho de CV-02 (Figura 17, pág 55), apresentou uma banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$  podendo ser de uma carbonila conjugada, uma banda em  $1593\text{ cm}^{-1}$  podendo ser relacionadas a possíveis vibrações de ligações  $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ , duas bandas em  $1461\text{ cm}^{-1}$  e  $1360\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação angular C-H e uma banda em  $1181\text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de ligação C-O.

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02 (Figura 20, pág 56) revelou a presença de 10 absorções relativas a carbonos não hidrogenados (C), 3 absorções relativas a 5 carbonos monoidrogenados (CH) e 4 carbonos referentes a carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

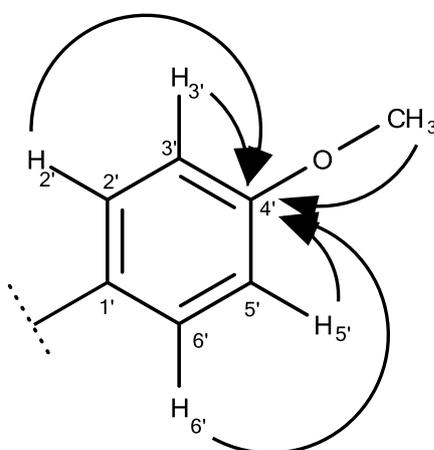
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02 (Figura 19, pág 56) são observadas 19 linhas espectrais, dentre as quais uma em  $\delta_{\text{C}} 179,14$  característica de uma carbonila, 12 linhas na faixa de  $\delta_{\text{C}} 90,5$  a  $\delta_{\text{C}} 161,9$  podendo ser carbonos insaturados dos quais 7 foram atribuídos a carbonos oxigenados  $\delta_{\text{C}} 132,48$ ,  $138,93$ ,  $152,56$ ,  $152,97$ ,  $156,25$ ,  $158,96$  e  $161,91$ , 2 linhas em  $\delta_{\text{C}} 114,29$  e  $\delta_{\text{C}} 130,36$ , além de 4 linhas podendo ser relacionadas a carbonos oxigenados de grupos metoxila em  $\delta_{\text{C}} 55$ ,  $65$ ,  $56,52$ ,  $60,36$  e  $61,10$ .

A partir da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02 (Figura 21, pág 57) foram observados sinais na região característica de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{H}} 6,51$  (s, H-8) e dois dupletos em  $\delta_{\text{H}} 7,02$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}} 8,07$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H, H-3' e H-5') com mesmo valor de acoplamento ( $J$ ) e integração para dois hidrogênios cada, sugerindo a presença de um anel aromático *para*-dissubstituído, e 4 simpletos com integração para 3 hidrogênios cada em  $\delta_{\text{H}} 3,86$ ,  $\delta_{\text{H}} 3,90$ ,  $\delta_{\text{H}} 3,92$  e  $\delta_{\text{H}} 3,96$  se tratando de 4 metoxilas, e ainda um sinal em  $\delta_{\text{H}} 12,62$  característico de hidroxila quelada.

A partir dos dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$ , apresentando 11 lacunas, compatível com o espectro de massa obtido (Figura 18, pág 55) que mostrou o pico do íon-molecular com razão massa/carga ( $m/z$ ) de 358 daltons. Portanto, CV-02 assim como CV-01 pode ser relacionado a um flavonoide do tipo flavona, com a estrutura básica de 15 carbonos (Figura 6, pág 43).

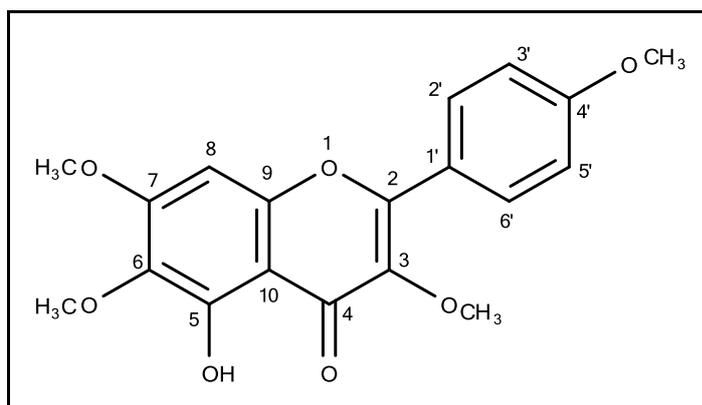
O diagrama de contorno RMN 2D HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02 (Figuras 22 e 23, págs 57 e 58) revelou os acoplamentos C-H a uma ligação, relacionando os

hidrogênios a seus respectivos carbonos. O espectro de correlação heteronuclear a duas ou mais ligações RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02 (Figura 24, pág 58) revelou a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,02 (H-2' e H-6') e em  $\delta_{\text{H}}$  8,07 (H-3' e H-5') como também dos hidrogênios da metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 ( $\text{OCH}_3 - 3\text{H-4}'$ ) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  161,9 (C-4') corroborando para a presença de um anel aromático para-substituído (subestrutura 5). As demais correlações encontradas no espectro HMBC são idênticas às encontradas para a estrutura de CV-01, possibilitando determinar a estrutura de CV-02 também como uma flavona, diferindo de CV-01 apenas no anel "B".



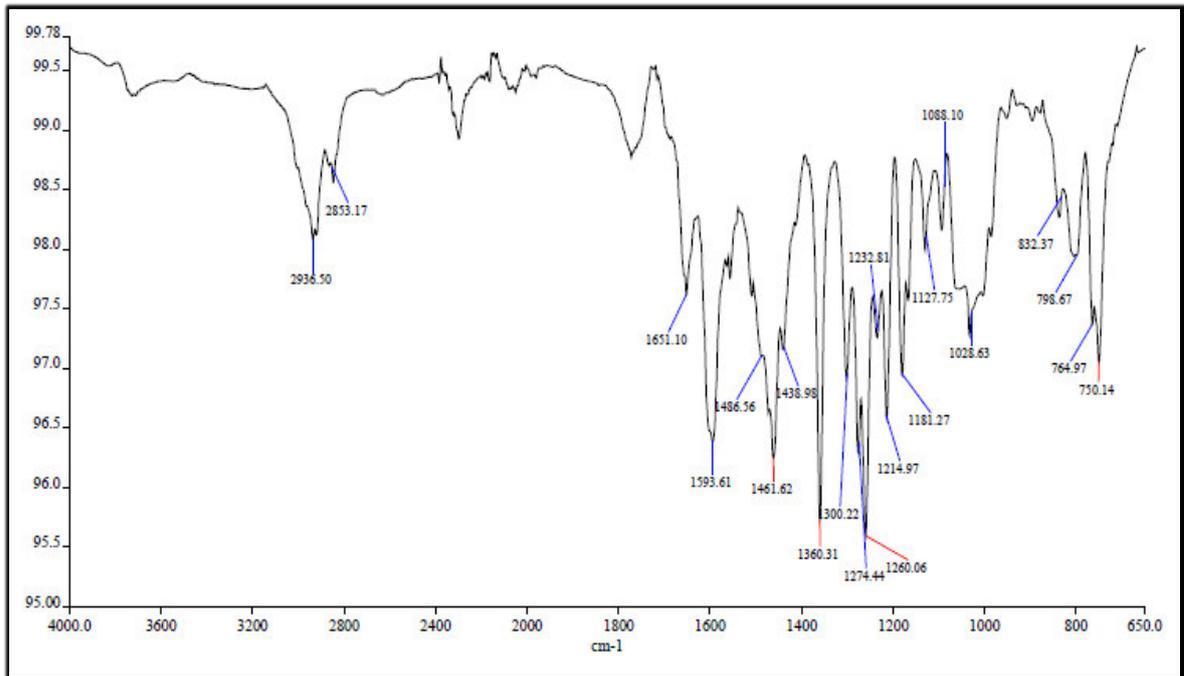
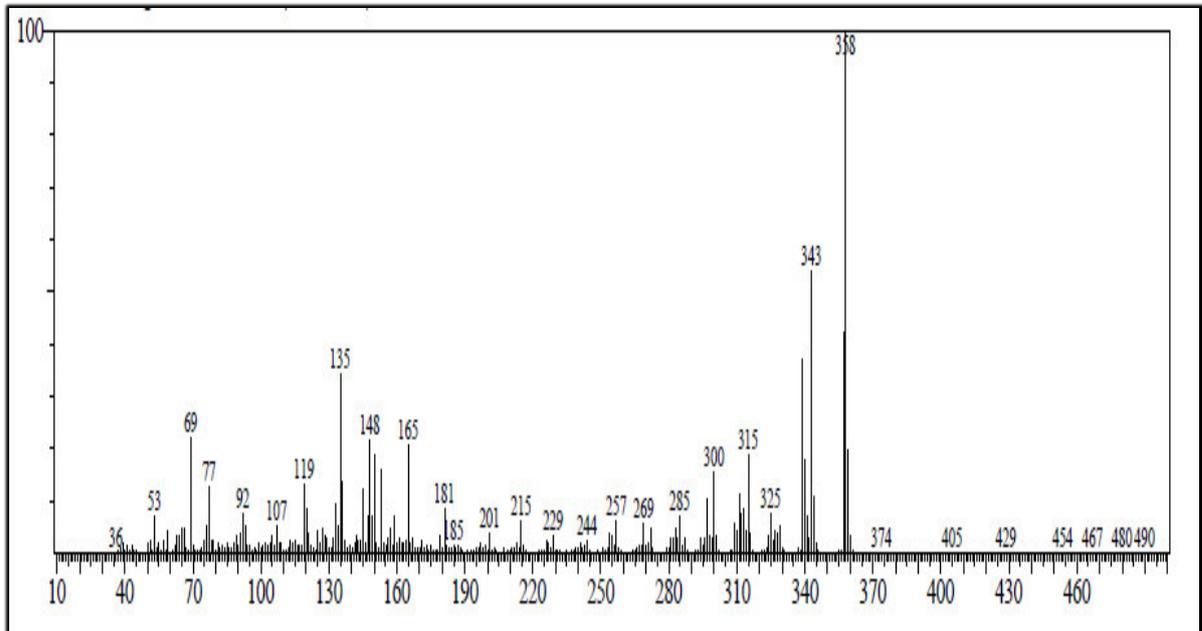
Subestrutura 5

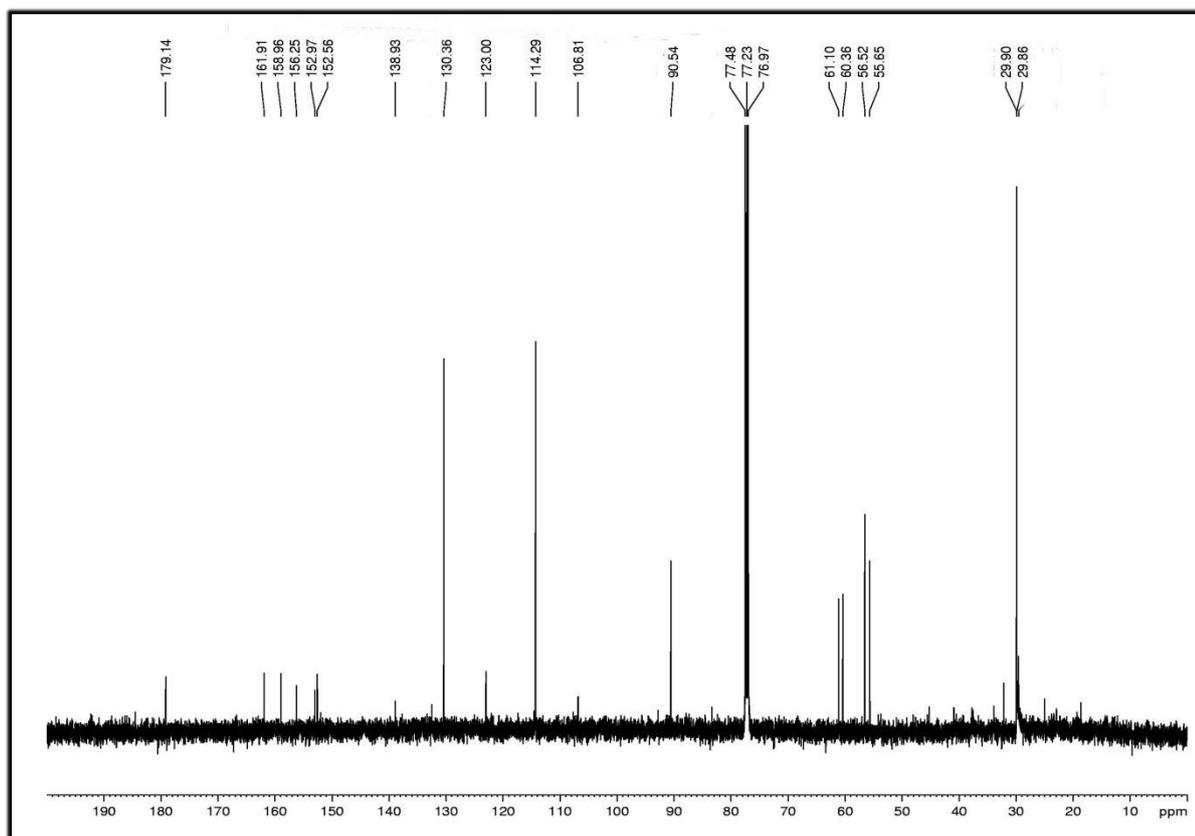
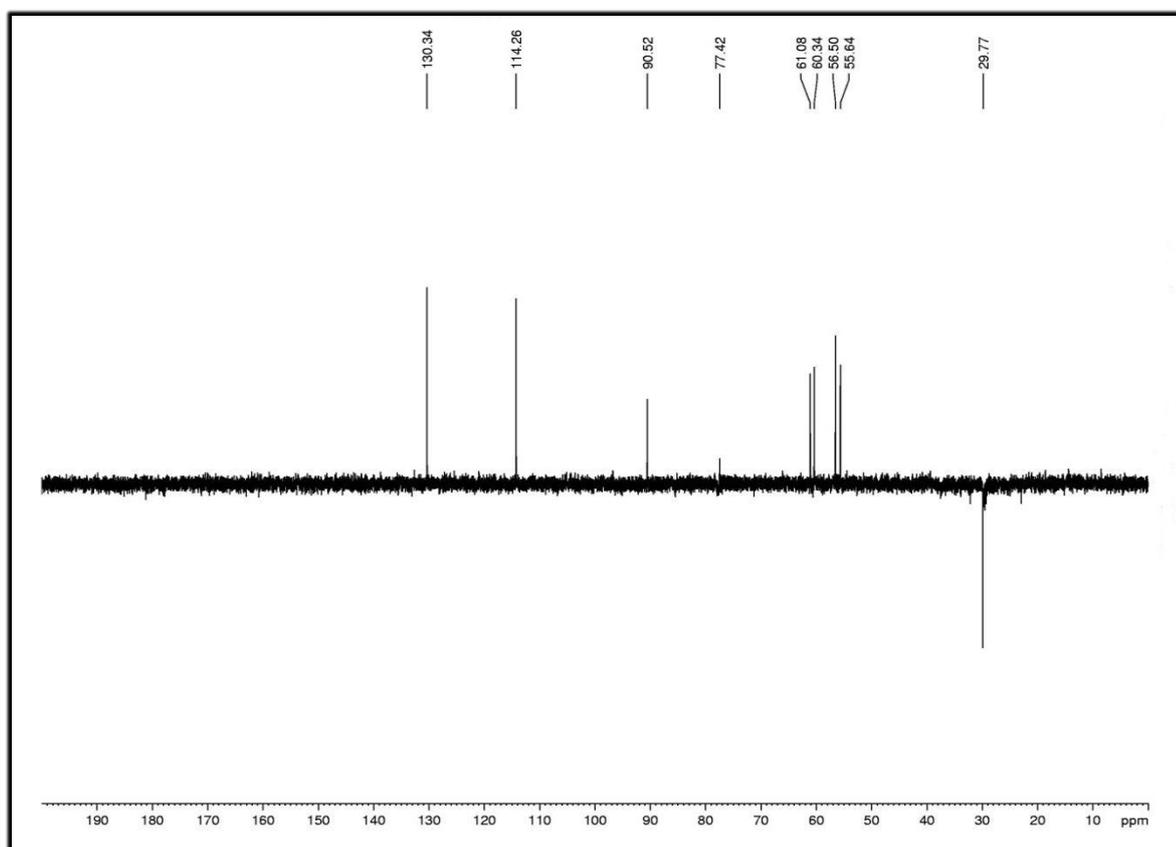
Os dados até então discutidos permitiram sugerir a estrutura de uma tetrametoxiflavona monohidroxilada. A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CV-02 com os dados descritos na literatura (PAULA e CRUZ, 2006) (Tabela 13, pág 54) permitiram caracterizar o composto como 5 - hidroxil-3, 6, 7, 4'-tetrametoxiflavona (Figura 16, pág 54). Tal composto já foi isolado no gênero *Croton*, especificamente na espécie *Croton muscicarpa* (GOMES, 2010).

**Figura 16:** 5-hidroxi-3, 6, 7, 4'-tetrametoxiflavona (CV-02)**Tabela 13:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações de HSQC e HMBC ( $^2J$  e  $^3J$ ) ( $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02, comparado com valores da literatura de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

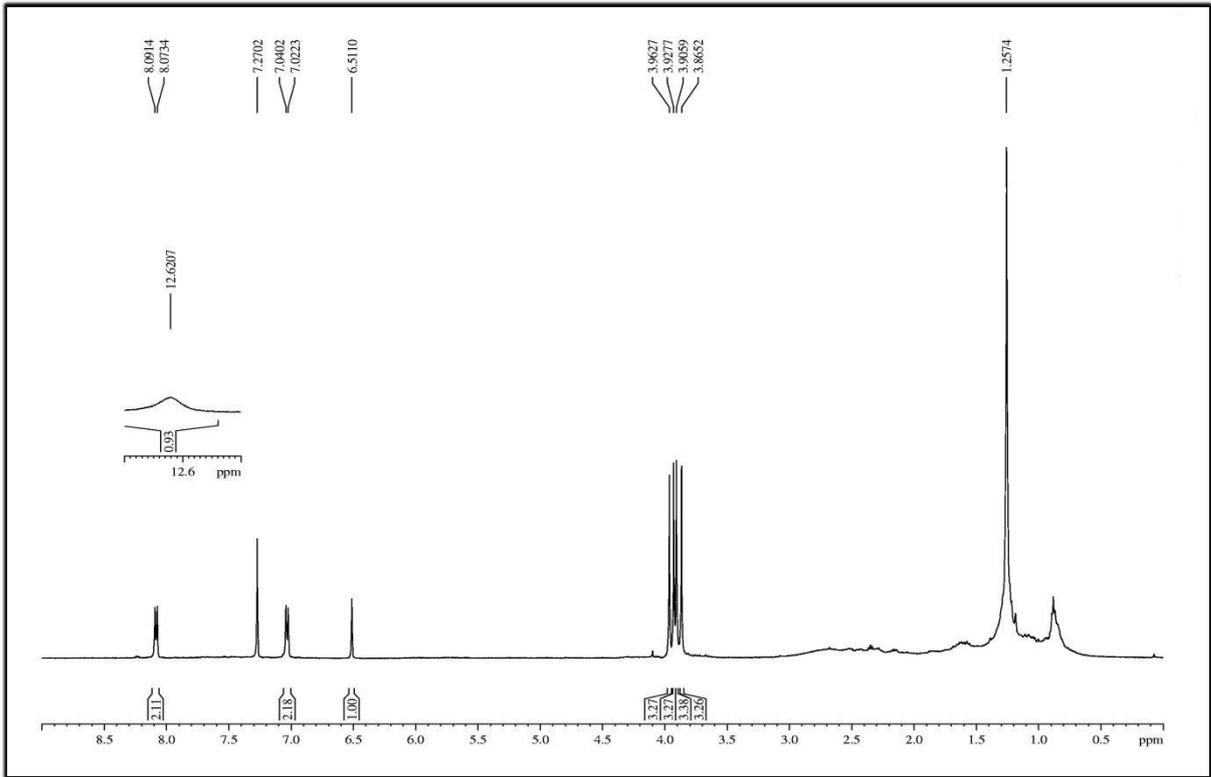
C	HSQC (CV-02)		HMBC (CV-02)			5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona*	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$^2J$	$^3J$	$^4J$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
2	156,2	-	-	-	-	156,3	-
3	138,9	-	-	3-OMe	-	139,0	-
4	179,1	-	-	-	H-8	179,2	-
5	152,9	-	-	-	-	152,6	-
6	132,4	-	-	H-8; 6-OMe	-	132,3	-
7	158,9	-	H-8	7-OMe	-	159,0	-
8	90,5	6,51 (s, 1H)	-	-	-	90,5	6,50 (s, 1H)
9	152,5	-	H-8	-	-	153,0	-
10	106,8	-	-	H-8	-	106,8	-
1'	123,0	-	-	H-5'	-	123,0	-
2'	130,3	8,07 (d, 2H, 9,0 Hz)	-	H-6'	-	130,4	8,08 (d, 2H, 9,0 Hz)
3'	114,2	7,02 (d, 2H, 9,0 Hz)	-	H-5'	-	114,3	7,02 (d, 2H, 9,0 Hz)
4'	161,9	-	H-5'	H-6'; 4'-OMe	-	161,9	-
5'	114,2	-	-	-	-	114,3	-
6'	130,3	-	-	H-2'	-	130,4	-
3-OMe	60,3	3,86 (s; 3H)	-	-	-	60,4	3,87 (s; 3H)
6-OMe	61,1	3,90 (s; 3H)	-	-	-	61,2	3,93 (s; 3H)
7-OMe	56,5	3,92 (s; 3H)	-	-	-	56,6	3,96 (s; 3H)
4'-OMe	55,6	3,96 (s; 3H)	-	-	-	55,7	3,99 (s; 3H)

\*(PAULA e CRUZ, 2006)

**Figura 17:** Espectro de absorção no infravermelho de CV-02**Figura 18:** Espectro de Massa (IE, 70 eV) de CV-02

**Figura 19:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02**Figura 20:** Espectro de RMN DEPT  $135^\circ$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02

**Figura 21:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02



**Figura 22:** Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) CV-02

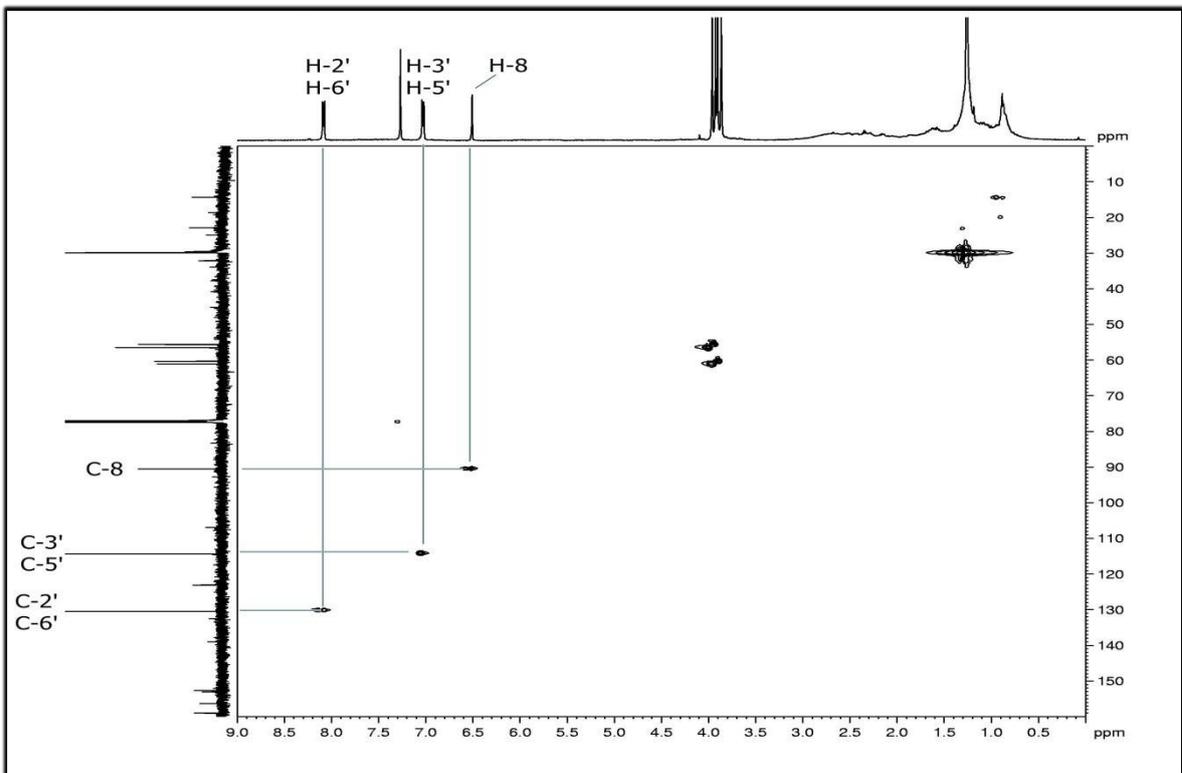


Figura 23: Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) CV-02 (Expansão)

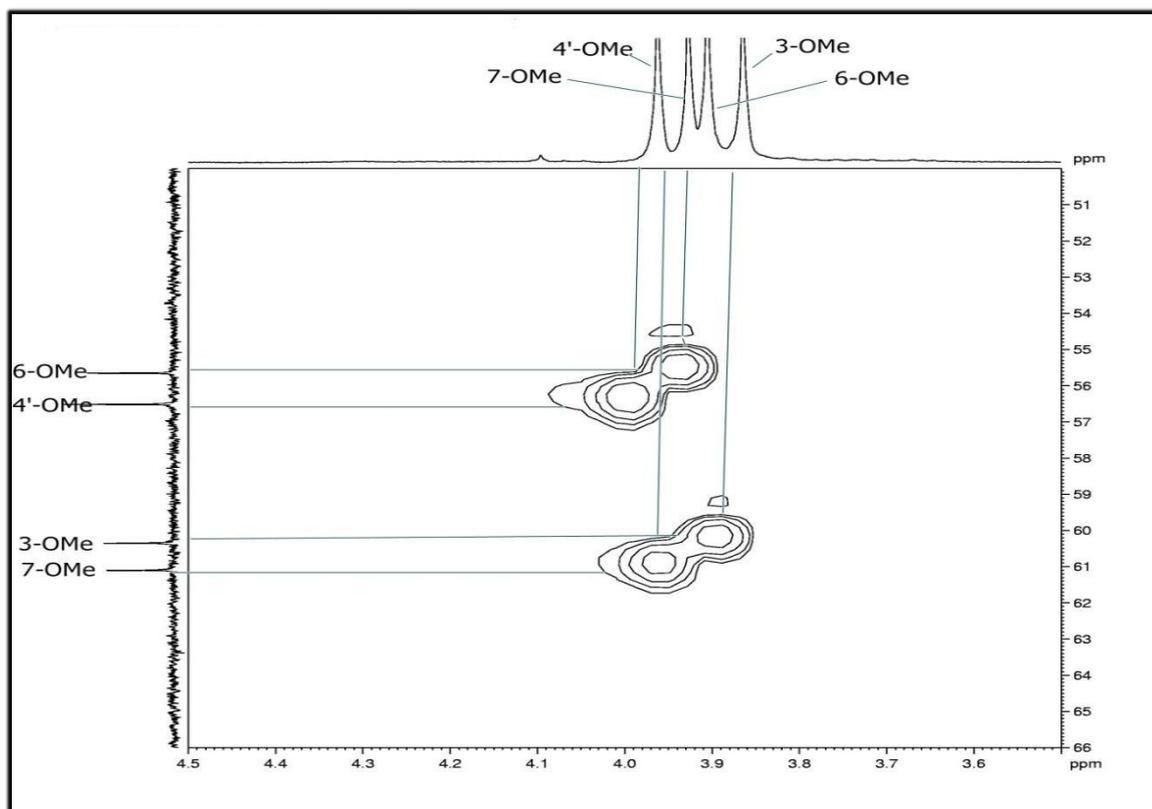
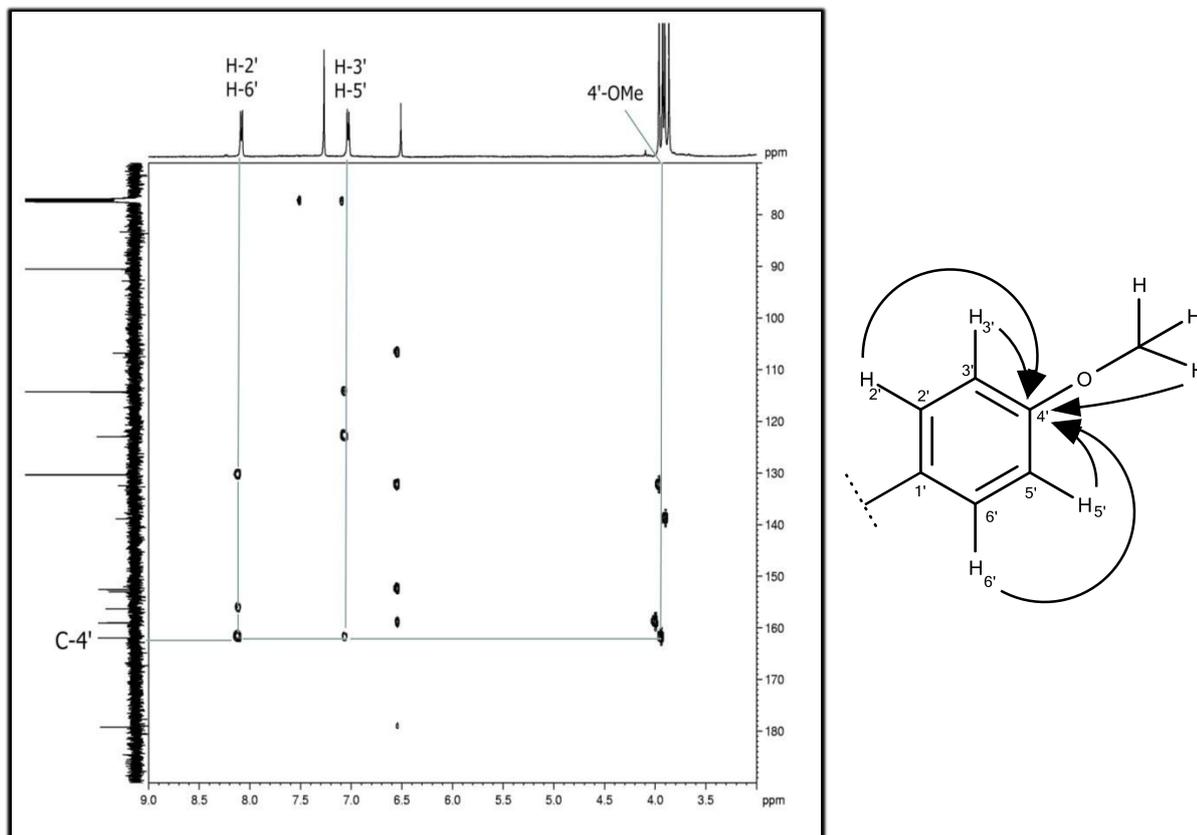


Figura 24: Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-02



### 4.3 Determinação Estrutural de CV-03

O tratamento cromatográfico da fração CVET-Ac, a partir do extrato etanólico dos talos de *Croton velutinus*, utilizando cromatografia de gel de sílica e CLAE, levou a obtenção de 6,1 mg de uma resina alaranjada  $[\alpha]_D +71,66^\circ \pm 0,66$  (MeOH;  $c$  0,1) denominada CV-03 (Item 3.1.5, pág 33).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 27, pág 64) apresentou uma banda larga em  $3397\text{ cm}^{-1}$  podendo se tratar de uma deformação axial de ligação O-H, bem como uma absorção intensa em  $1657\text{ cm}^{-1}$  relacionada a uma deformação axial de ligação C=O, podendo se tratar de uma carbonila conjugada e uma banda em  $2966\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de ligação C-H de C- $sp^3$ . Ainda no mesmo espectro, foi observada uma banda em  $1107\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de ligação C-O.

Comparando os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 29, pág 65), observa-se a presença de 4 absorções relativas a carbonos não hidrogenados (C), 2 absorções relativas a carbonos monoidrogenados (CH), 5 absorções relativas a carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e 4 carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

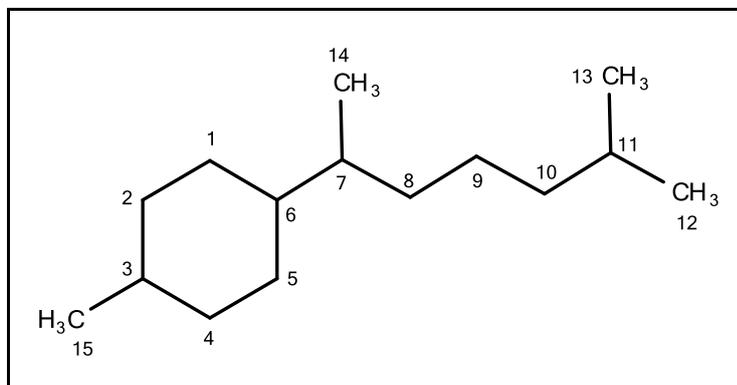
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 28, pág 65), foram observadas 15 linhas espectrais, dentre elas uma em  $\delta_C$  199,9 característica de uma carbonila conjugada, 2 linhas em  $\delta_C$  145,9 e  $\delta_C$  133,8 na região referentes a carbonos  $sp^2$ , 12 linhas na região de carbonos  $sp^3$ ,  $\delta_C$  71,4;  $\delta_C$  68,3 referentes a carbonos oxigenados, e demais sinais em  $\delta_C$  44,4, 43,8, 40,3, 38,7, 29,4, 29,3, 26,9, 23,5, 17,9, 15,3.

Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 30, pág 66), foi possível observar um simpleto intenso com integração para 6 hidrogênios em  $\delta_H$  1,05 correspondendo a duas metilas magneticamente equivalentes, dois simpletos em  $\delta_H$  1,01 com integração para 3 hidrogênios cada se tratando de duas metilas. O simpleto largo em  $\delta_H$  1,29 revela a sobreposição de sinais de hidrogênio, seis como mostra a integração, referente a três  $\text{CH}_2$ . Observam-se ainda os sinais em  $\delta_H$  2,17, 2,25 e  $\delta_H$  2,19, 2,37 (dd,  $J=16\text{Hz}; 2\text{Hz}$ ), um multipletto em  $\delta_H$  1,95 e um dupletto largo em  $\delta_H$  6,83 (d,  $J=4,4\text{Hz}$ ), característico de hidrogênio ligado a carbono olefínico.

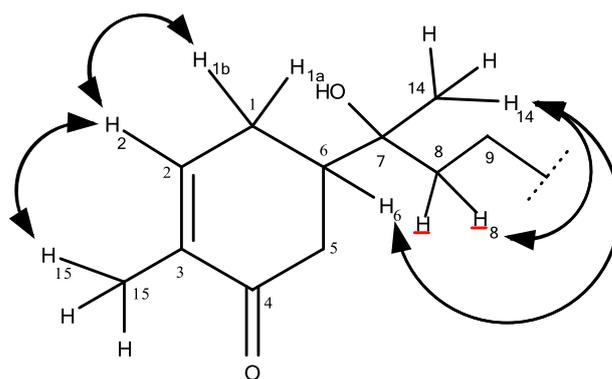
Após análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível propor a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ , apresentando 3 lacunas, uma das quais foi relacionada a uma carbonila, uma relacionada a um ciclo e outra relacionada a uma ligação dupla. O deslocamento de RMN  $^{13}\text{C}$

das metilas magneticamente equivalentes permite sugerir que CV-03 trata-se de um sesquiterpeno com esqueleto do tipo bisabolano (Figura 25).

**Figura 25:** Esqueleto tipo bisabolano



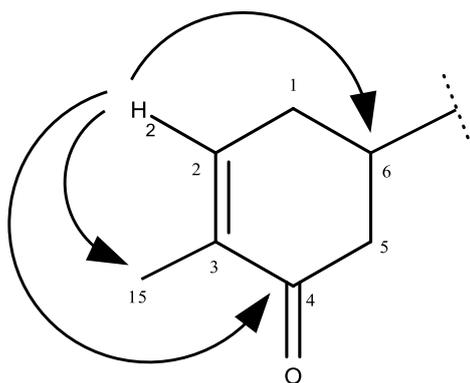
No espectro de correlação homonuclear COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 31, pág 66), foram observados acoplamentos vicinais ( $^3J$ ) e alílicos ( $^4J$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (H-2) com o hidrogênio metilênico em  $\delta_{\text{H}}$  2,25 (Hb-1) e com os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,65 (3H-15), assim como dos hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (3H-14) com o hidrogênio metínico em  $\delta_{\text{H}}$  1,95 (H-6) e com os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,29 (2H-8) (subestrutura 6).



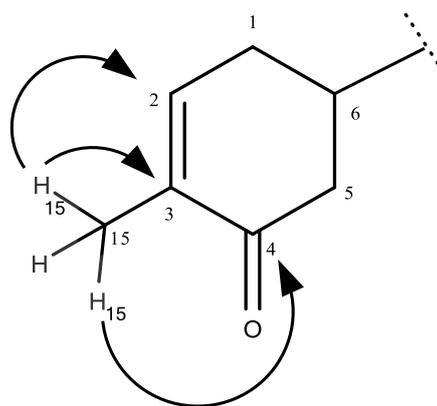
Subestrutura 6

O diagrama de contorno RMN HSQC 2D  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figuras 32 e 33, pág 67) revelou 11 correlações heteronucleares a  $^1J$ , dentre os quais destacam-se os acoplamentos C-H a uma ligação, assim como a presença de hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,17 (Ha-1), 2,25 (Hb-1),  $\delta_{\text{H}}$  2,19 (Ha-5) e 2,37 (Hb-5), , sugerindo a presença de carbonos quirais na molécula.

Segundo o espectro de correlação heteronuclear a duas ou mais ligações RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 34, pág 68) foram observadas as correlações dos hidrogênios com os carbonos a duas ( $^2J$ ) e três ( $^3J$ ) ligações, possibilitando o assinalamento inequívoco dos deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para CV-03, como as correlações do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (H-2) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  199,9 (C-4), 43,8 (C-6) e 15,3 (C-15) e dos hidrogênios da metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,65 (s, 3H-15) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  199,9 (C-4), 133,8 (C-3) e 145,9 (C-2) (subestruturas 7 e 8).

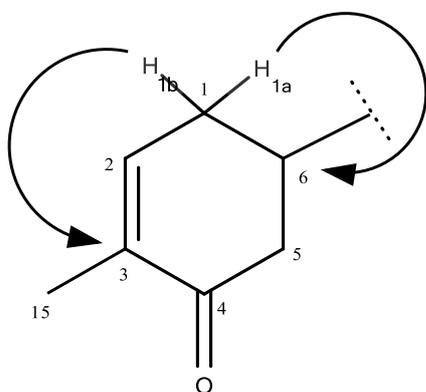


Subestrutura 7

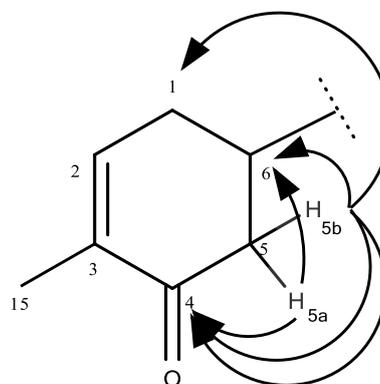


Subestrutura 8

No espectro HMBC (Figura 35, pág 68) são observadas as correlações de dois hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,17 (Ha-1), 2,25 (Hb-1) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  133,8 (C-3) e 43,8 (C-6) e  $\delta_{\text{H}}$  2,19 (Hb-5), 2,37 (Hb-5) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  199,9 (C-4), 26,9 (C-1) e 43,8 (C-6) (subestruturas 9 e 10).

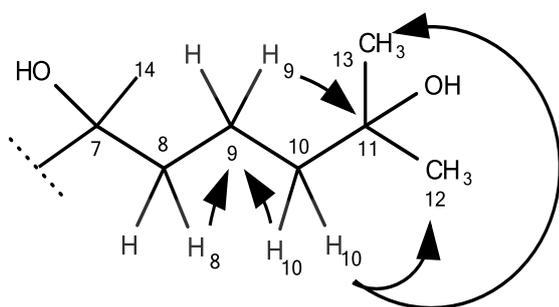


Subestrutura 9

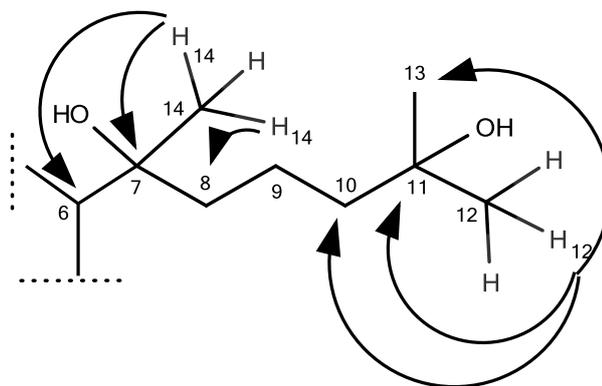


Subestrutura 10

O espectro HMBC (Figura 36, pág 69) ainda revelou as correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  1,29 (2H-8), (2H-9) e (2H-10) que aparecem como um único sinal, simples, no espectro de RMN  $^1H$  com os carbonos em  $\delta_C$  68,8 (C-11), 44,4 (C-10), 29,4 (C-12), 29,3 (C-13) e 17,9 (C-9) (subestrutura 11), assim como os hidrogênios das metilas em  $\delta_H$  1,01 (3H-14) com os carbonos em  $\delta_C$  71,4 (C-7), 43,8 (C-6) e 40,3 (C-8) e os hidrogênios das metilas magneticamente equivalentes em  $\delta_H$  1,05 (6H-12 e 13) com os carbonos em  $\delta_C$  68,8 (C-11), 44,4 (C-10), 29,4 (C-12) e 29,3 (C-13) (subestrutura 12).

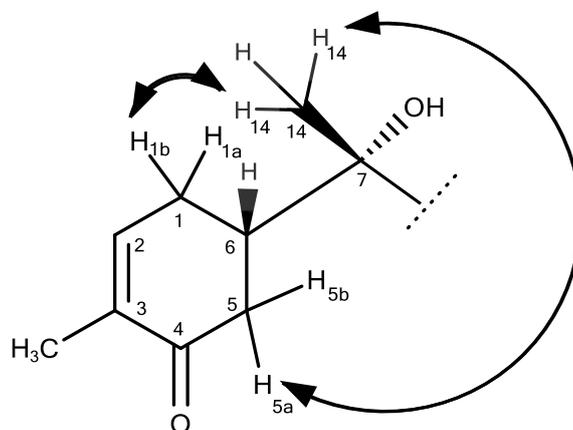


Subestrutura 11



Subestrutura 12

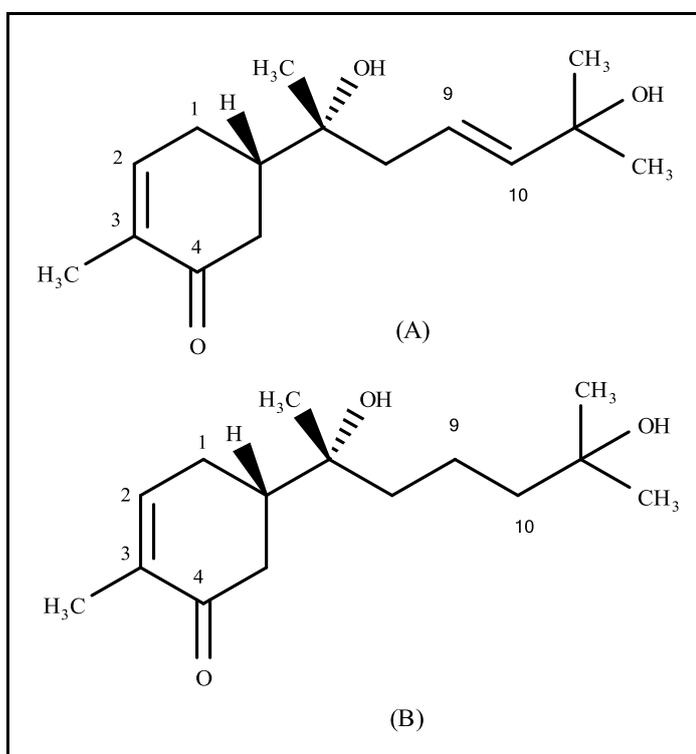
A expansão do espectro de correlação homonuclear RMN NOESY 2D  $^1H \times ^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Figura 37, pág 69) comparados com o espectro de COSY 2D  $^1H \times ^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Figura 31, pág 66) de CV-03, permitiu a determinação da estereoquímica relativa de CV-03 o qual revelou o acoplamento espacial entre os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,01 (s, 3H-14) com os hidrogênios em  $\delta_H$  2,25 (m, Hb-1) e  $\delta_H$  2,19 (m, Ha-5) (subestrutura 13).



Subestrutura 13

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que CV-03 se trata do sesquiterpeno (6*S*, 7*S*) - 7, 11 - diidroxí- bisabol-2-en-4-ona (Figura 26B), substância até então inédita na literatura. Um composto semelhante foi isolado por Mladenova *et al.*, (1987) a partir das flores de *Chrysanthemum indicum*, o composto foi denominado de Indicumenona (Figura 26A). O composto ainda foi isolado por Trifunovic *et al.*, (2006) das partes aéreas de *Achillea clavennae*, diferindo de CV-03 apenas pela presença de uma instauração no carbono 9. Os dados de CV-03 foram comparados com os da literatura (Tabela 14, pág 64).

**Figura 26:** Estruturas dos compostos Indicumenona (A) e (6*S*, 7*S*) – 7,11 – diidroxí--bisabol-2-en-4-ona (B)



**Tabela 14:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações de HSQC e HMBC ( $^2J$  e  $^3J$ ) (DMSO- $d_6$ ) de CV-03, comparado com valores da literatura de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

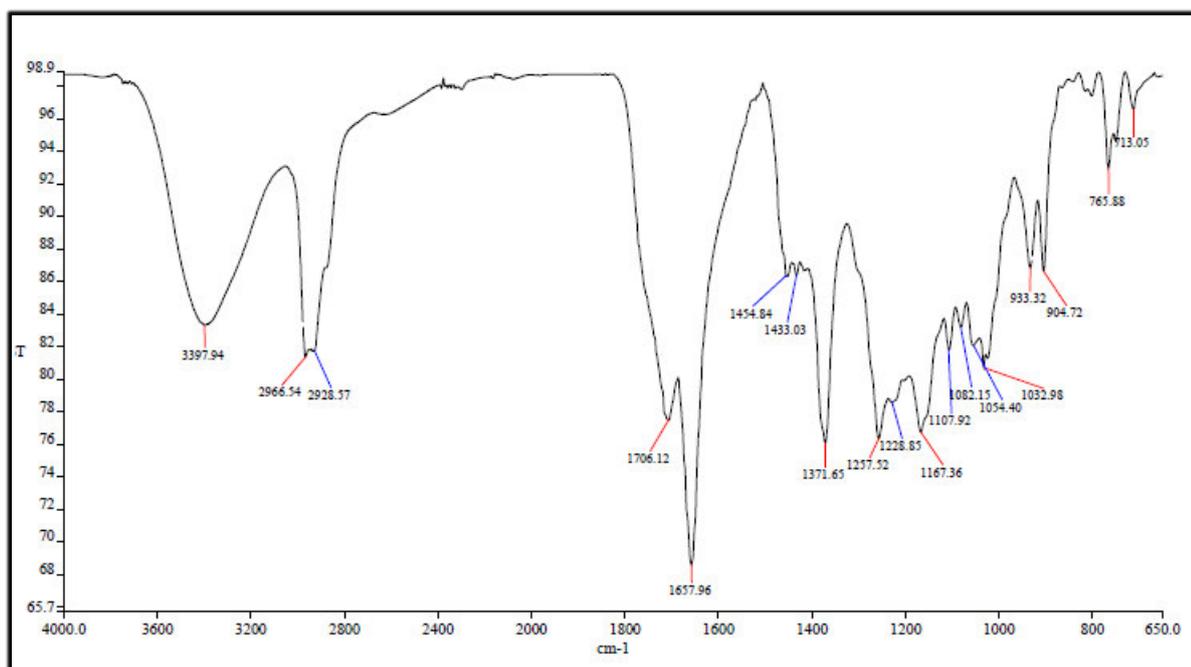
C	HSQC		HMBC		Indicumenona <sup>a*</sup>	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$^2J$	$^3J$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}^b$
1	26,9	1Ha - 2,17 (m); 1Hb - 2,25 (m)	-	Ha-5;Hb-5	27,2	2,24(m) ;2,35(dl)
2	145,9	1H - 6,83 (dl, 4,4Hz)	-	3H-15	144,9	6,75 (dl, 5,5 Hz)
3	133,8	-	3H-15	Ha-1	135,3	-
4	199,9	-	Ha-5;Hb-5	H-2;3H-15	200,4	-
5	38,7	5Ha-2,19 (m);5Hb-2,37 (dd, 16; 2Hz)	-	-	38,8	2,24(m); 2,66(16Hz)
6	43,8	1H - 1,95 (m)	Ha-5;Hb-5	H-2;3H-14	44,1	2,24 (m)
7	71,4	-	3H-14	-	72,8	-
8	40,3	2H - 1,29 (sl)	-	3H-14	42,3	2,13 (m); 2,24 (m)
9	17,9	2H - 1,29 (sl)	2H-8;2H-10	-	121,0	5,71 (m)
10	44,4	2H - 1,29 (sl)	-	3H-12;3H-13	143,0	5,71 (m)
11	68,8	-	3H-12;3H-13	2H-9	70,7	-
12	29,4	6H - 1,05 (sl)	-	3H-13;2H-10	29,8	1,34 (s)
13	29,3	6H - 1,05 (sl)	-	3H-12;2H-10	29,7	1,34 (s)
14	23,5	3H - 1,01 (s)	-	-	23,9	1,18 (s)
15	15,3	3H - 1,65 (s)	-	H-2	15,6	1,78 (s)

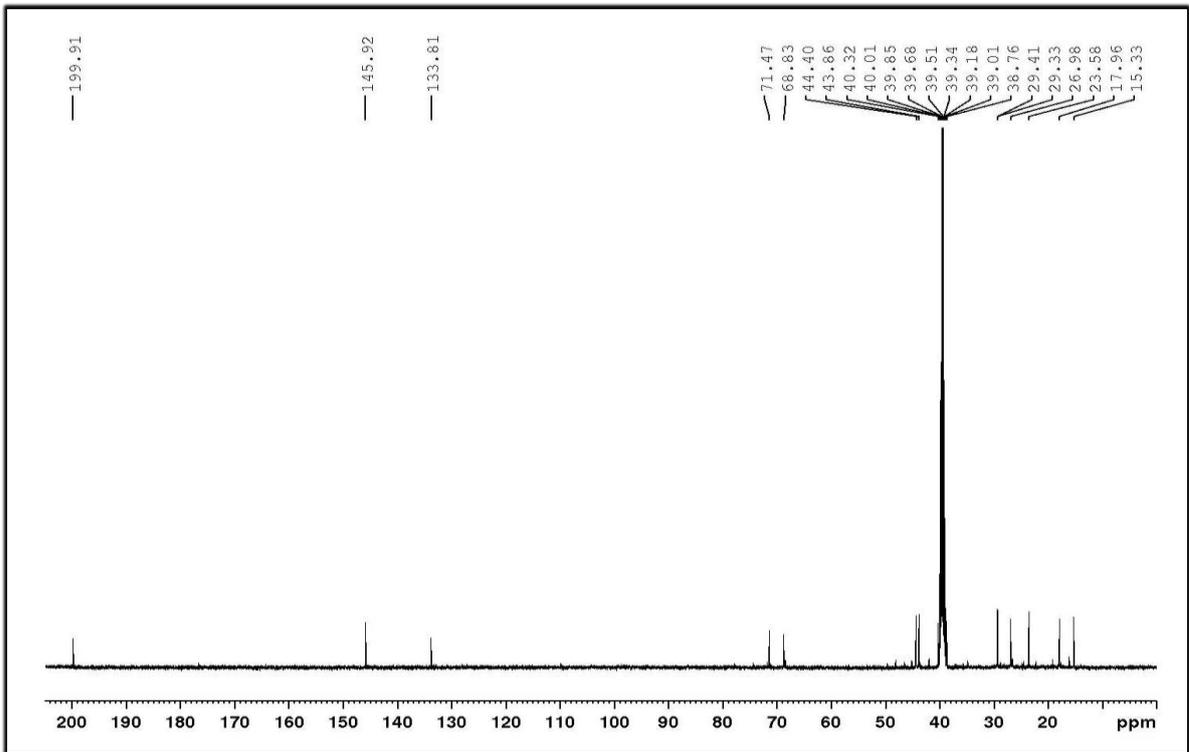
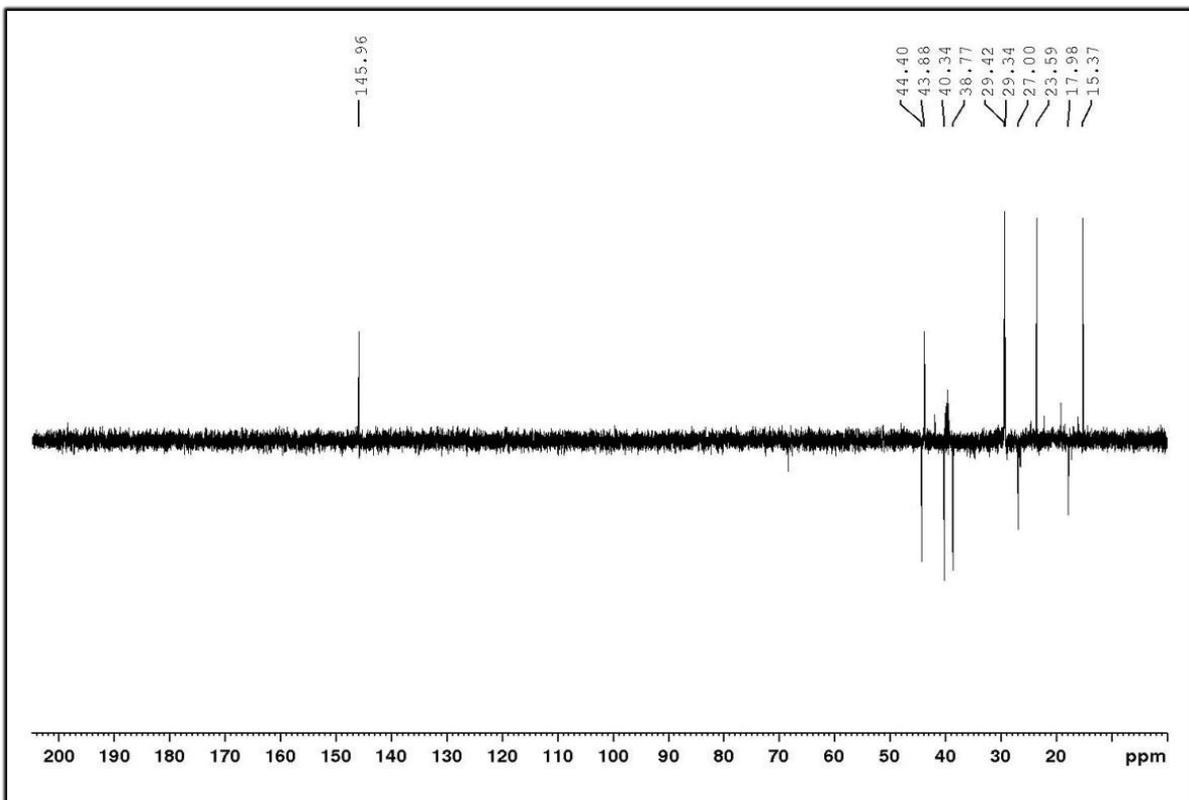
<sup>a\*</sup> TRIFUNOVIC, *et al.*, 2006;<sup>b</sup>

\*\*sl = simpleto largo,

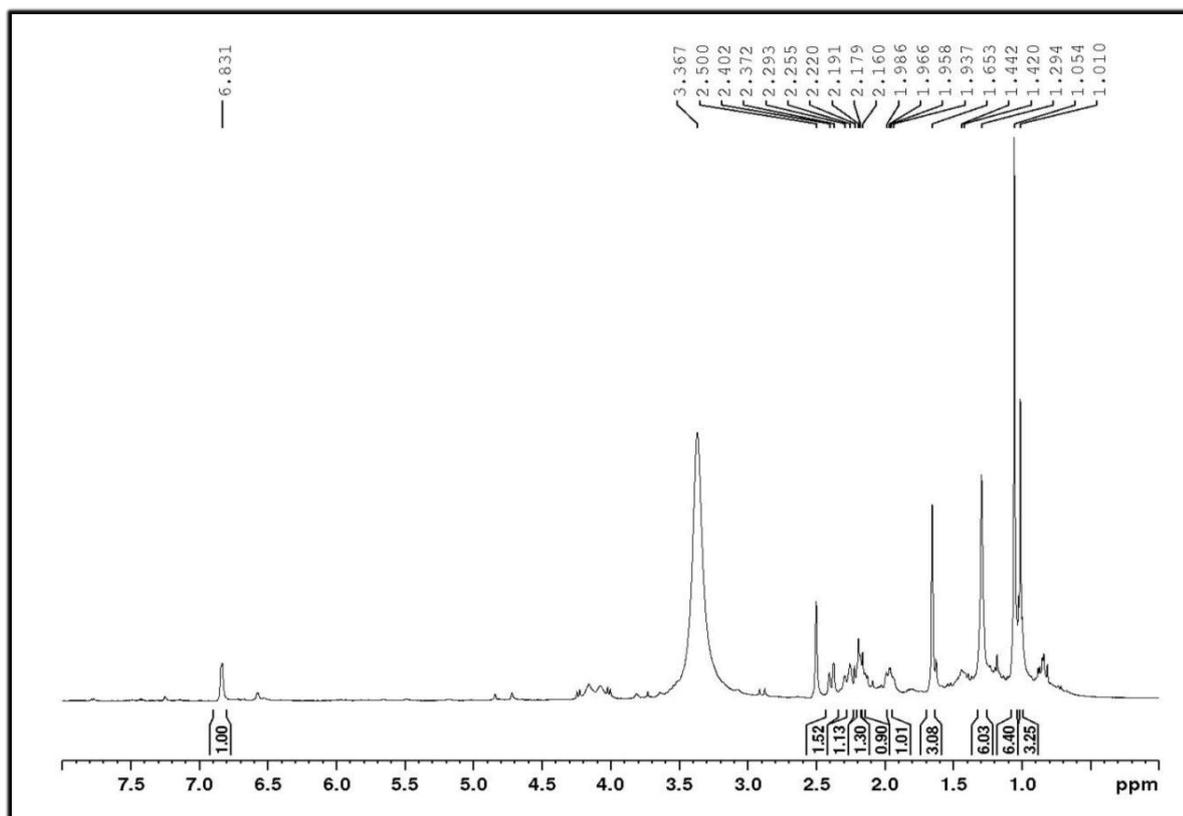
\*\*\*dl = dupleto largo

**Figura 27:** Espectro de absorção na região do Infravermelho de CV-03

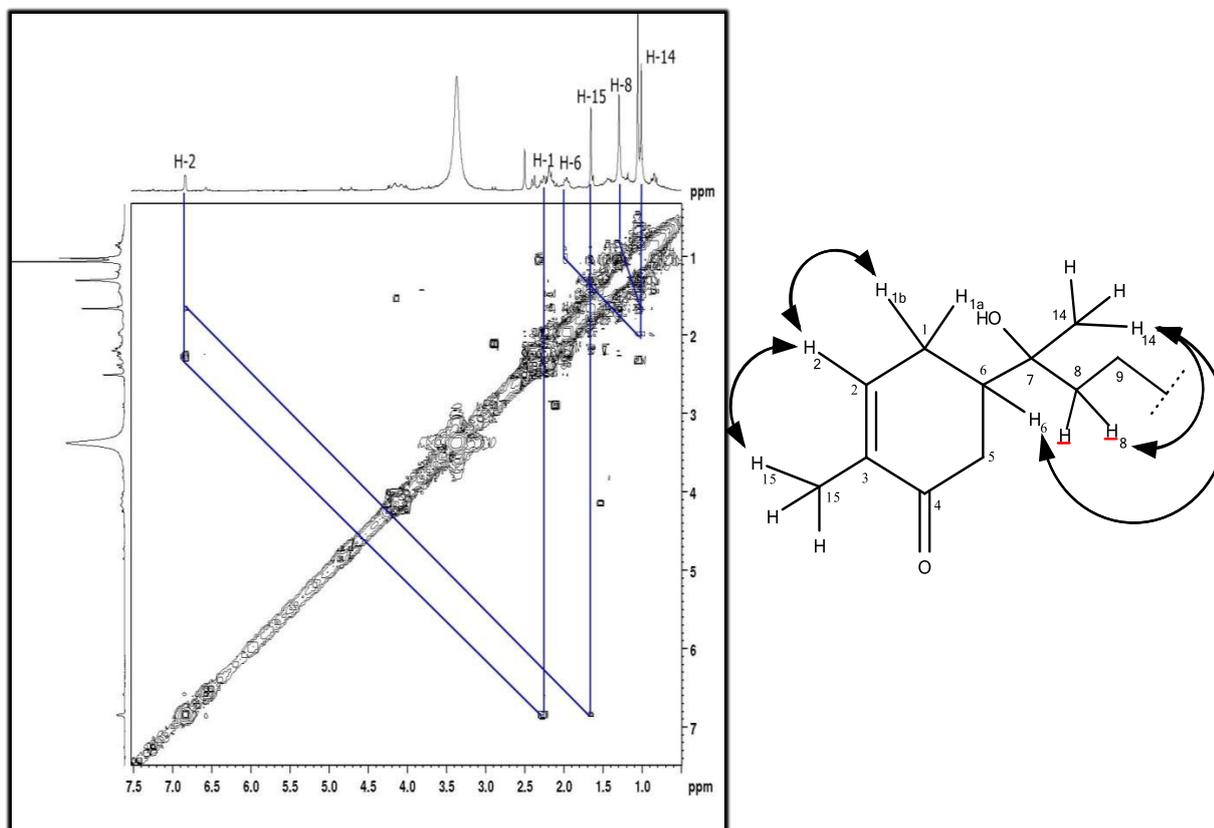


**Figura 28:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03**Figura 29:** Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03

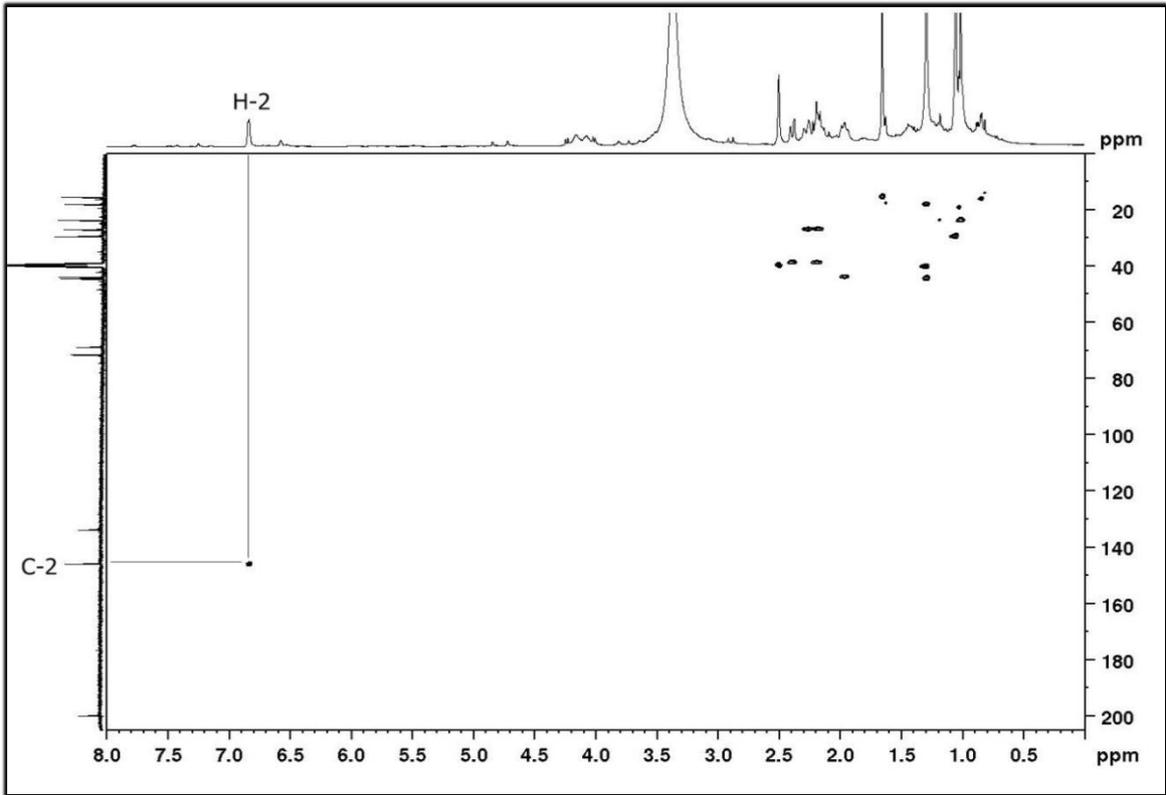
**Figura 30:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de CV-03



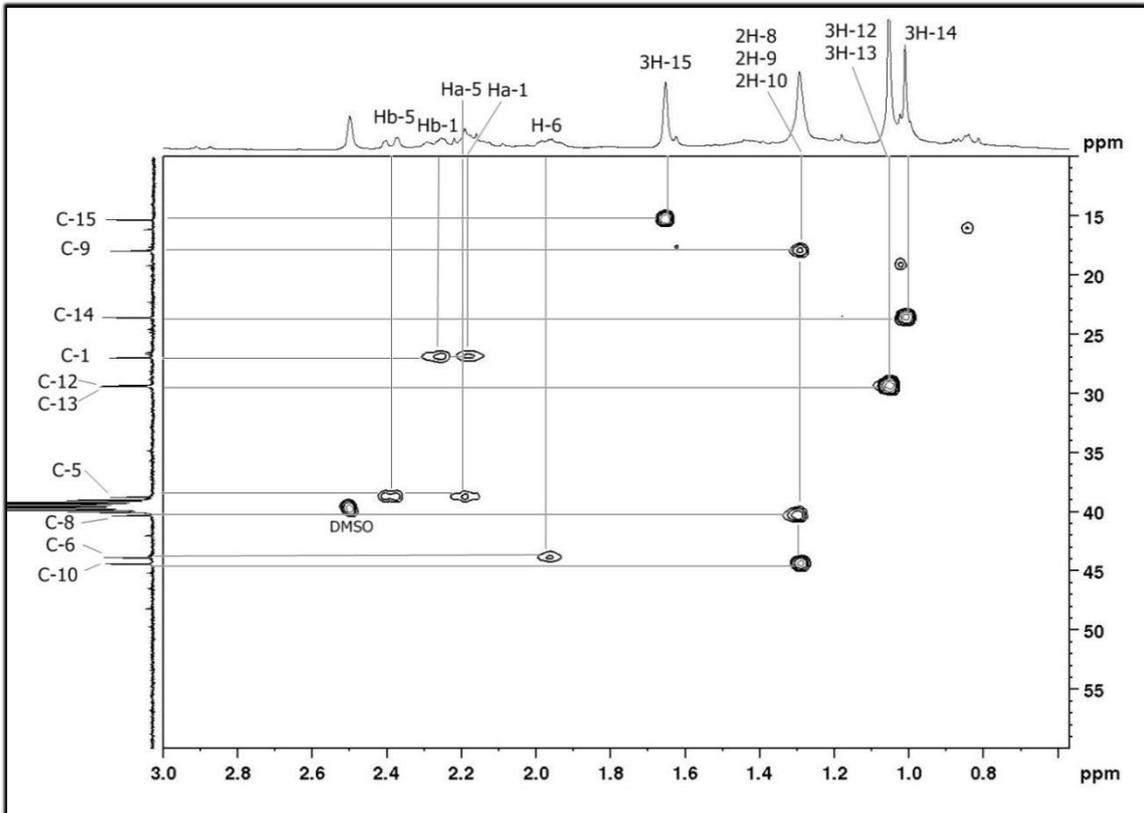
**Figura 31:** Espectro de RMN 2D COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de CV-03



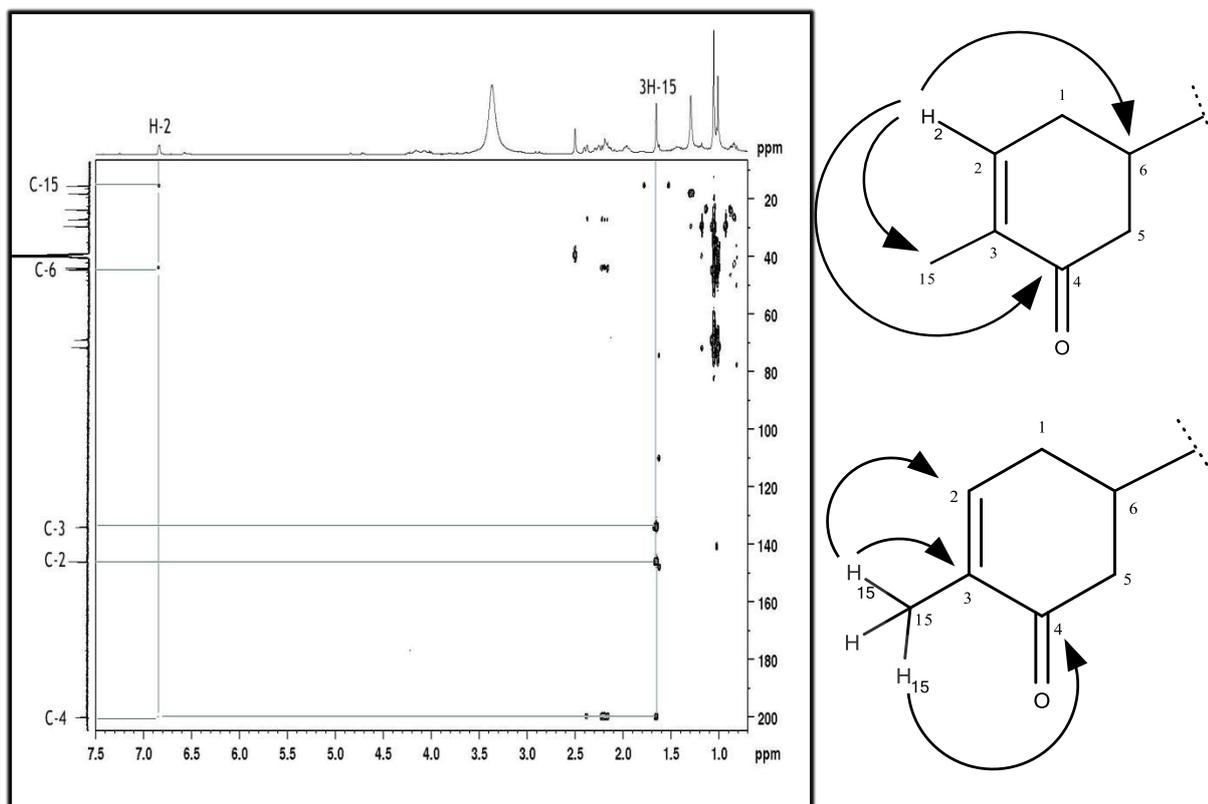
**Figura 32:** Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03



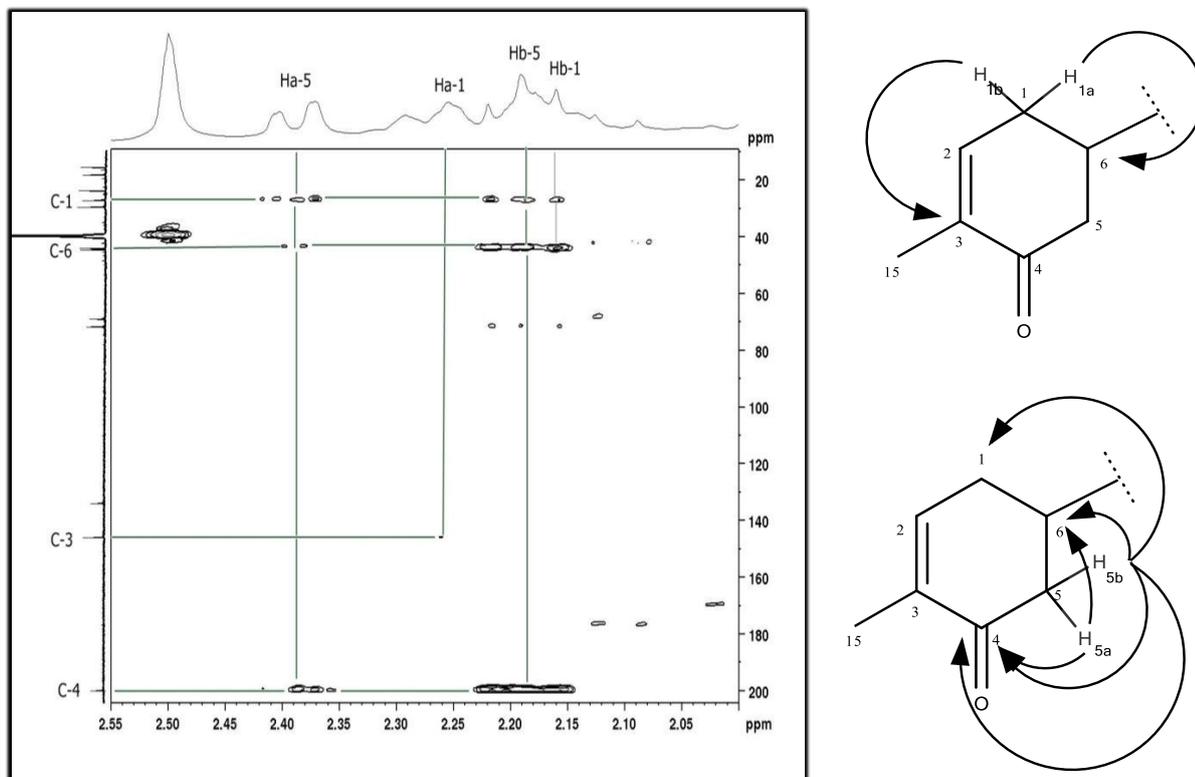
**Figura 33:** Espectro de RMN 2D HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Expansão)



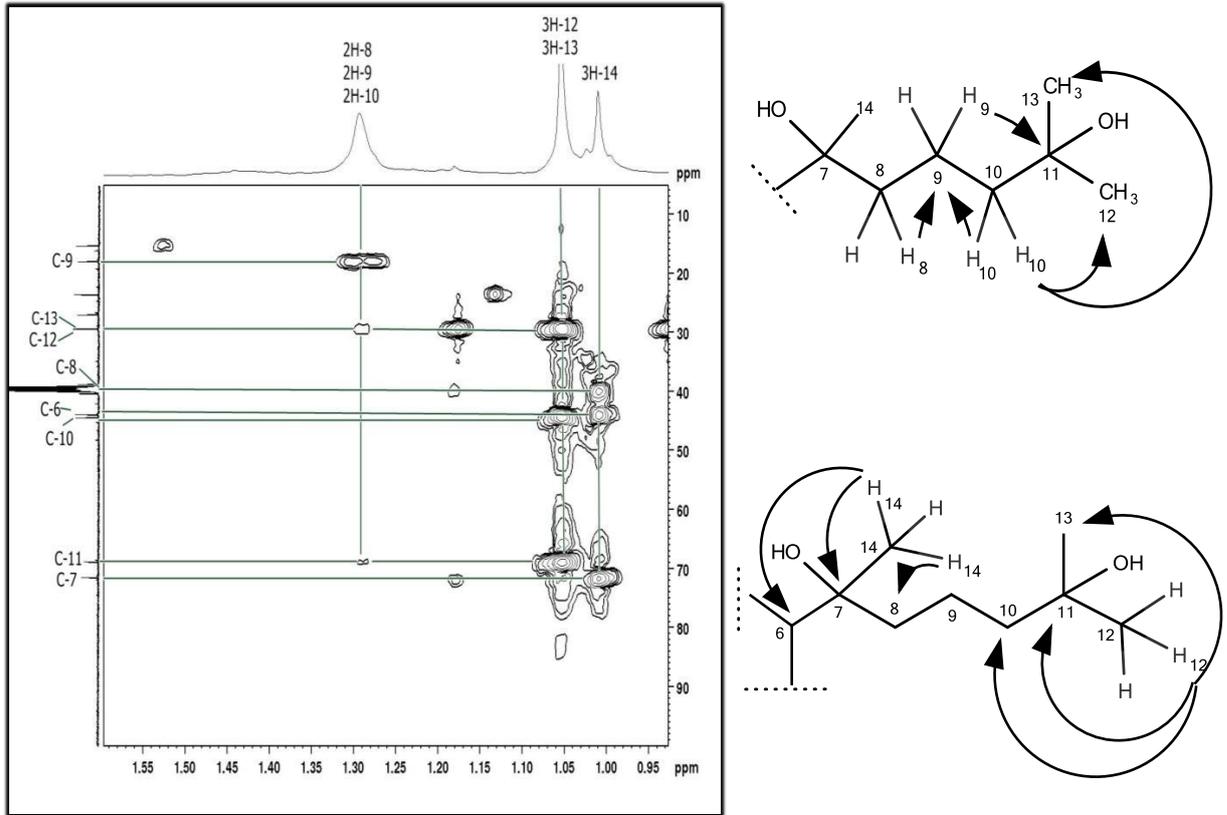
**Figura 34:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03



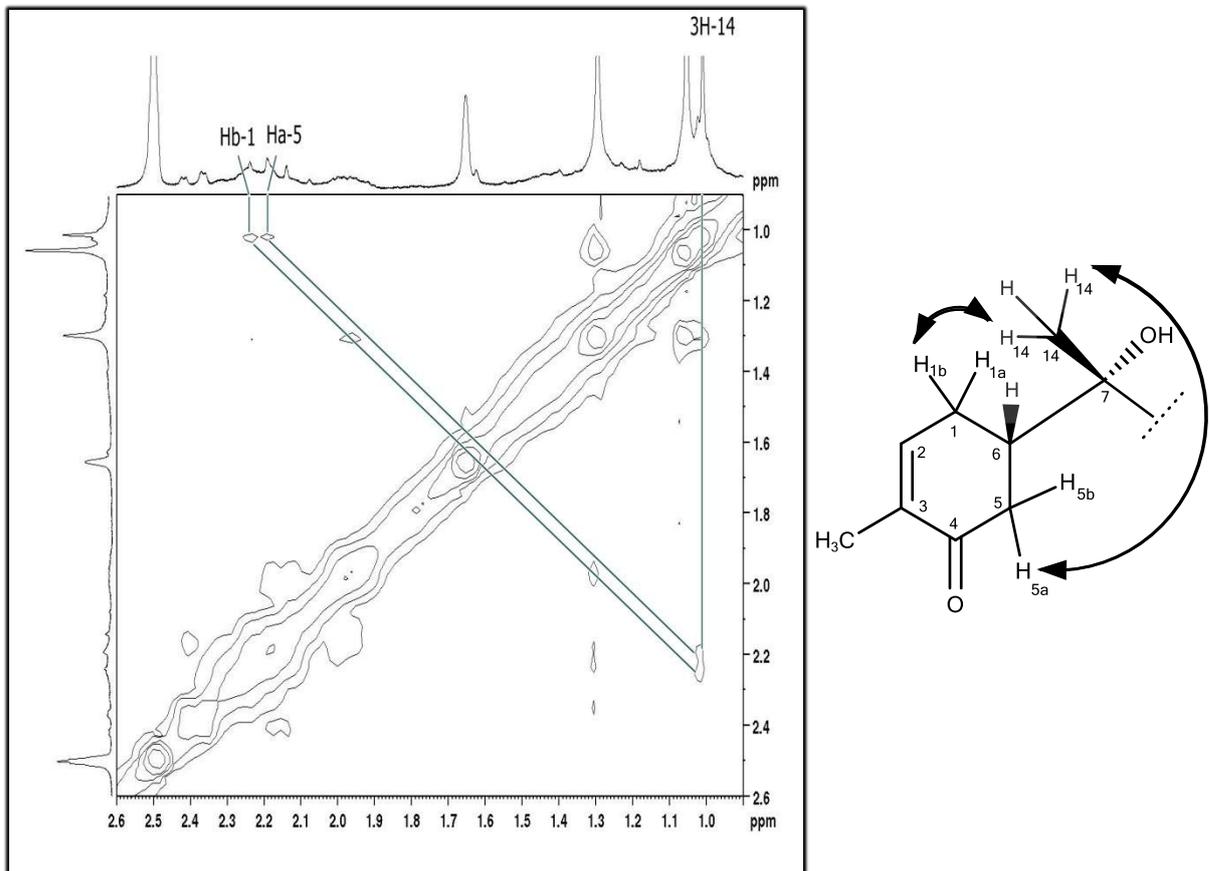
**Figura 35:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Expansão)



**Figura 36:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Expansão 2)



**Figura 37:** Espectro de RMN NOESY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-03 (Expansão)



#### 4.4 Determinação estrutural de CV-04

O tratamento cromatográfico da fração CVET-E, a partir do extrato etanólico dos talos de *Croton velutinus*, utilizando Sephadex-LH20 e CLAE, foram obtidos 3,9 mg de uma resina alaranjada  $[\alpha]_D +89,86^\circ \pm 0,80$  (MeOH ;  $c$  0,1) denominada CV-04 (Item 3.1.6, pág 36).

Comparando os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figura 40, pág 75), são observadas 4 absorções referentes a carbonos não hidrogenados (C), 3 referentes a carbonos monoidrogenados (CH), 4 referentes a carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e 4 absorções relativas a carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

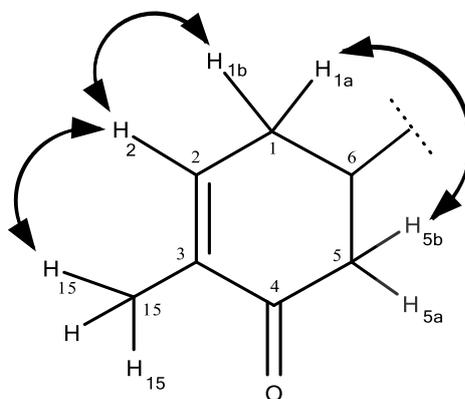
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figura 39, pág 75) revela 15 linhas espectrais sendo uma em  $\delta_C$  200,0 relativa a uma carbonila conjugada e outros 4 sinais com deslocamentos característicos de carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta_C$  146,0, 133,9, 130,4, 124,8. Na região de carbonos  $\text{sp}^3$ , foram observados 10 sinais, sendo um em  $\delta_C$  71,2, característico de carbono oxigenado, dois sinais se encontram sobrepostos ao sinal do solvente em  $\delta_C$  39,6 e 38,7, e outros sete sinais foram observados em  $\delta_C$  43,9, 26,9, 25,4, 23,2, 21,8, 17,4 e 15,2.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figura 41, pág 76) revelou um duplete em  $\delta_H$  1,65 (d,  $J=1,0\text{Hz}$ ) e três simpletos em  $\delta_H$  1,63,  $\delta_H$  1,55 e  $\delta_H$  1,01 todos com integração para três hidrogênios cada corroborando com a presença de 4 metilas na molécula. Foram observados também dois multipletos em  $\delta_H$  6,82 e  $\delta_H$  5,10 com integração para um hidrogênio cada e com deslocamentos característicos de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos. Observa-se ainda um multiplete em  $\delta_H$  1,34 com integração para dois hidrogênios. Na região entre  $\delta_H$  1,31 a 2,42 são observados sinais com multiplicidade e deslocamentos idênticos aos de CV-03 referentes aos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  2,17, 2,25 e  $\delta_H$  2,19; 2,37 (dd,  $J=16\text{Hz}; 2\text{Hz}$ ), um multiplete em  $\delta_H$  1,95 com integração para um hidrogênio, além do já mencionado multiplete em  $\delta_H$  6,82, podendo então CV-04 apresentar estrutura semelhante a CV-03.

Após análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível propor a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , apresentando 4 lacunas. Uma das lacunas foi relacionada a uma carbonila, uma relacionada a um ciclo e outras duas relacionadas a duas ligações dupla, sugerindo CV-04 assim como CV-03, se tratar de um sesquiterpeno com esqueleto do tipo bisabolano (Figura 25, pág 60).

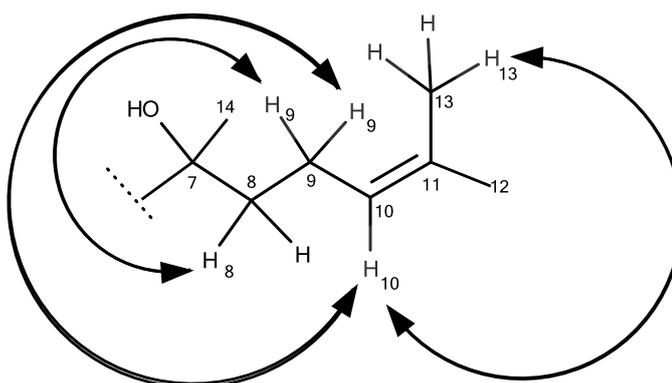
No espectro de correlação homonuclear COSY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figura 42, pág 76) revelou a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,82 (m, H-2) com os

hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,65 (s, 3H-15) e o hidrogênio em  $\delta_H$  2,25 (m, Hb-1) e ainda a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  2,17 (m, Ha-1) com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,37 (dd, Hb-5) (subestrutura 14).



Subestrutura 14

A expansão do espectro de RMN COSY (Figura 43, pág 77) ainda revelou as correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  1,93 (m, 2H-9) com os hidrogênios em  $\delta_H$  1,34 (m, 2H-8) e em  $\delta_H$  5,10 (m, H-10), este último ainda correlaciona com os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,63 (s, 3H-13) como mostrado na subestrutura 15.

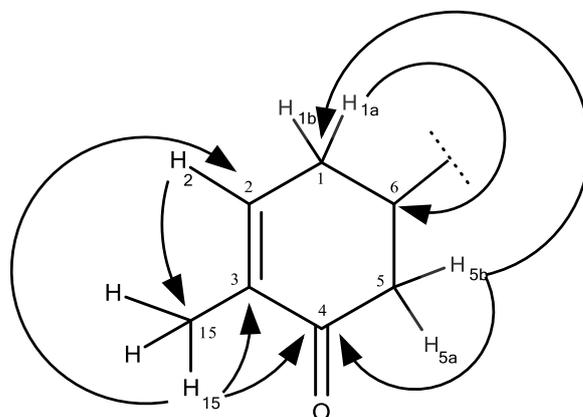


Subestrutura 15

O diagrama de contorno RMN 2D HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figuras 44 e 45, pág 77 e 78) revelou os acoplamentos C-H a uma ligação, relacionando os hidrogênios a seus respectivos carbonos, e assim como em CV-03, a presença de hidrogênios diastereotópicos,  $\delta_H$  2,17 (Ha-1), 2,25 (Hb-1) e  $\delta_H$  2,19 (Ha-5), 2,37 (Hb-5), com

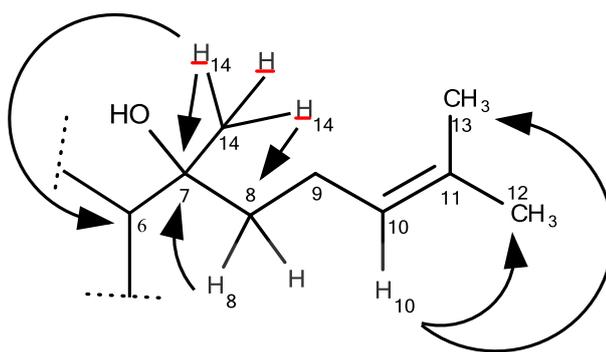
deslocamentos químicos diferentes mas ligados ao mesmo carbono, sugerindo a presença de carbonos quirais na molécula.

De acordo com o espectro de correlação heteronuclear a duas ou mais ligações RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Figura 46, pág 78), foram observadas as correlações dos hidrogênios com os carbonos a duas ( $^2J$ ) e três ( $^3J$ ) ligações. O hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,82 (d, H-2) correlaciona com o carbono da metila em  $\delta_{\text{C}}$  15,2 (C-15), e os hidrogênios da metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (s, 3H-15) correlacionam com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  146,0 (C-2), 133,9 (C-3) e 200,0 (C-4). Observa-se ainda a correlação do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2,17 (m, Ha-1) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  43,9 (C-6) e do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2,37 (m, Hb-5) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  26,9 (C-1) e 200,0 (C-4) (subestrutura 16).



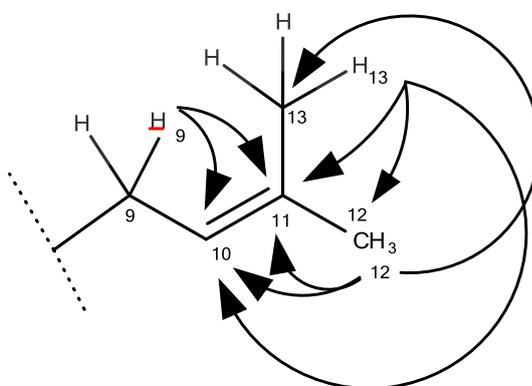
Subestrutura 16

O espectro de HMBC (Figura 47, pág 79) também mostra as correlações dos hidrogênios da metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (s, 3H-14) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  43,9 (C-6), 71,2 (C-7) e 39,8 (C-8) e do hidrogênio ligado a um carbono olefínico em  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (m, 1H-10) com os carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  17,4 (C-12) e 25,4 (C-13) além dos hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,34 (m, 2H-8) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  71,2 (C-7) (subestrutura 17).



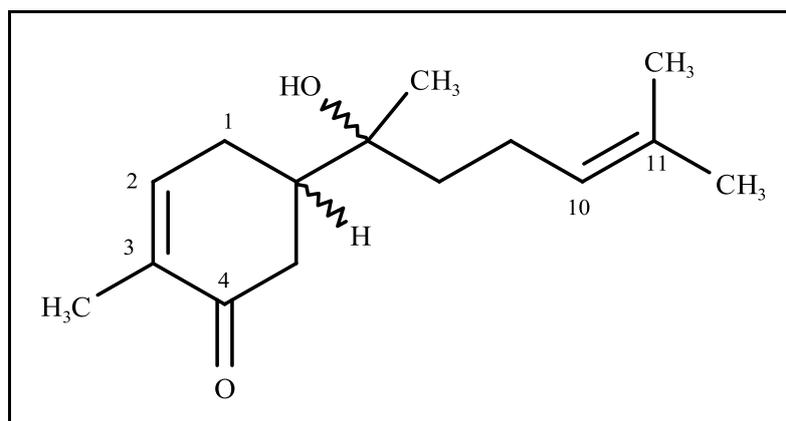
Subestrutura 17

Ainda de acordo com o espectro de HMBC (Figura 48, pág 79) foi possível observar as correlações dos hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,55 (s, 3H-12) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  124,8 (C-10), 130,4 (C-11) e 25,4 (C-13), os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,63 (s, 3H-13) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  124,8 (C-10) e 130,4 (C-11) e 17,4 (C-12), e os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,93 (m, 2H-9) com os carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  124,8 (C-10) e 130,4 (C-11) (subestrutura 18).



Subestrutura 18

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que CV-04 se trata do sesquiterpeno 7-hidroxi-bisabola-2,10-dien-4-ona, substância conhecida como Delobanona (Figura 38, pág 74). O composto foi isolado por Takeda, Sakurawi e Ishii (1971) a partir das raízes de *Lindera triloba*, e sintetizado por Taber, Bui e Chen (2001) e Smitt e Högberg (2002). Os dados de CV-04 foram comparados com os da literatura (Tabela 15, pág 74).

**Figura 38:** 7-hidroxi-bisabola-2,10-dien-4-ona (Delobanona)**Tabela 15:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações de HSQC e HMBC ( $^2J$  e  $^3J$ ) (DMSO- $d_6$ ) de CV-04, comparado com valores da literatura de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

C	HSQC		HMBC		*Delobanona	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$^2J$	$^3J$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
1	26,9	1H - 2,17 (m); 1H - 2,25 (m)	-	Hb-5	26,7	5H - 1,99 - 2,34 (m)
2	146,0	1H - 6,82 (m)	-	3H-15	145,3	1H - 6,78 (m)
3	133,9	-	3H-15	-	135,2	-
4	200,0	-	Hb-5	3H-15	200,2	-
5	38,7	1H-2,19 (m);1H-2,37 (dd,16;2Hz)	-	-	39,6	5H - 1,99 - 2,34 (m)
6	43,9	1H - 1,96 (m)	Ha-1	3H-14	44,2	5H - 1,99 - 2,34 (m)
7	71,2	-	3H-14;2H-8	-	73,4	-
8	39,8	2H - 1,34 (m)	-	3H-14	39,7	-
9	21,8	2H - 1,93 (m)	-	-	22,3	-
10	124,8	1H - 5,10 (m)	2H-9	3H-12;3H-13	123,9	1H - 5,12 (m)
11	130,4	-	-	2H-9	132,4	-
12	17,4	3H - 1,55 (s)	-	H-10;3H-13	17,7	3H - 1,49 - 1,57 (m)
13	25,4	3H - 1,63 (s)	-	H-10;3H-12	25,7	3H - 1,62 (s)
14	23,2	3H - 1,01 (s)	-	-	23,9	3H - 1,18 (s)
15	15,2	3H - 1,65 (d, 1,0 Hz)	-	H-2	15,6	3H - 1,69 (d, 1,0Hz)

\*(SMITT &amp; HÖGBERG, 2002)

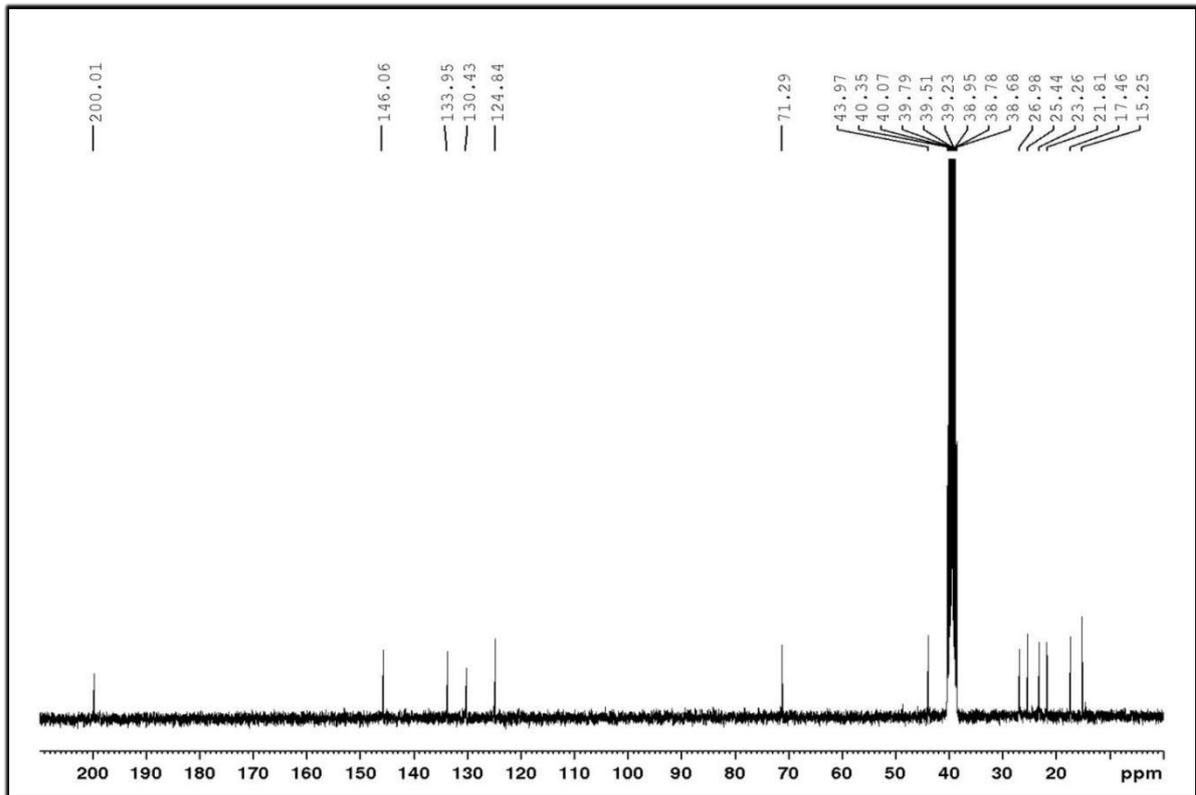
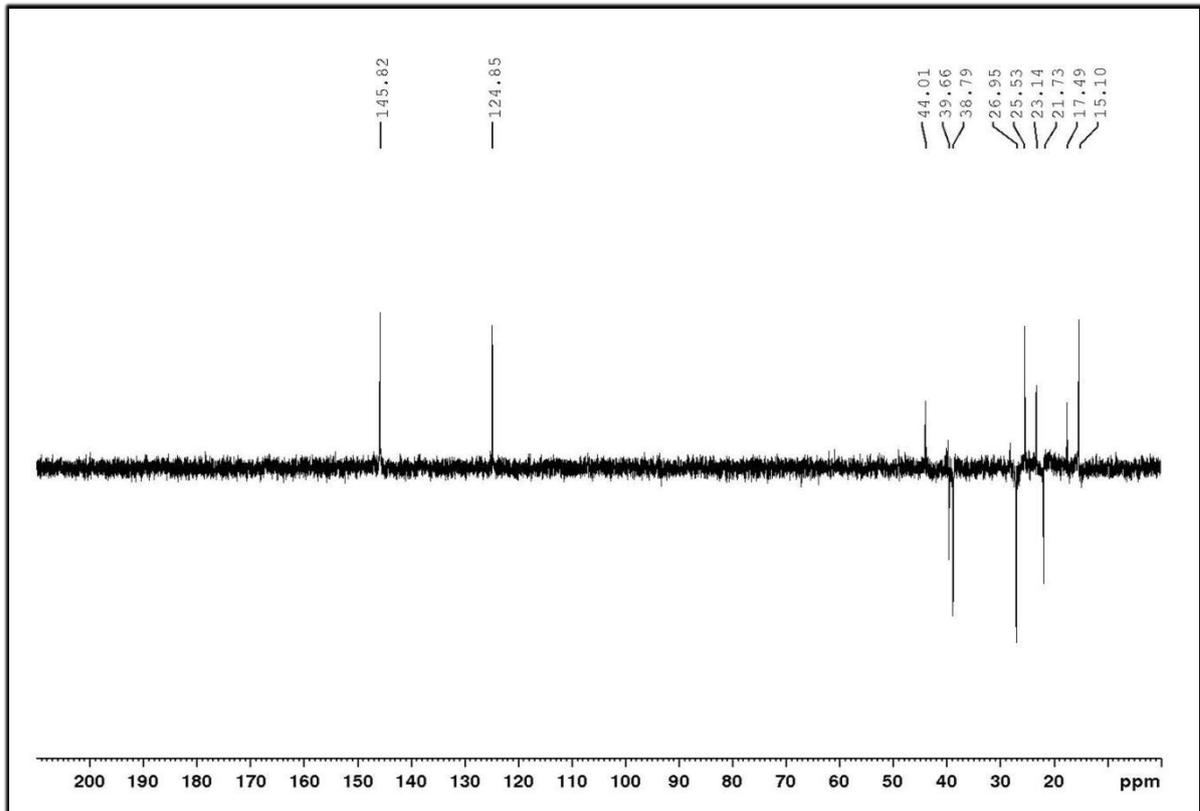
**Figura 39:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de CV-04**Figura 40:** Espectro de RMN DEPT 135° (75MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de CV-04

Figura 41: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de CV-04

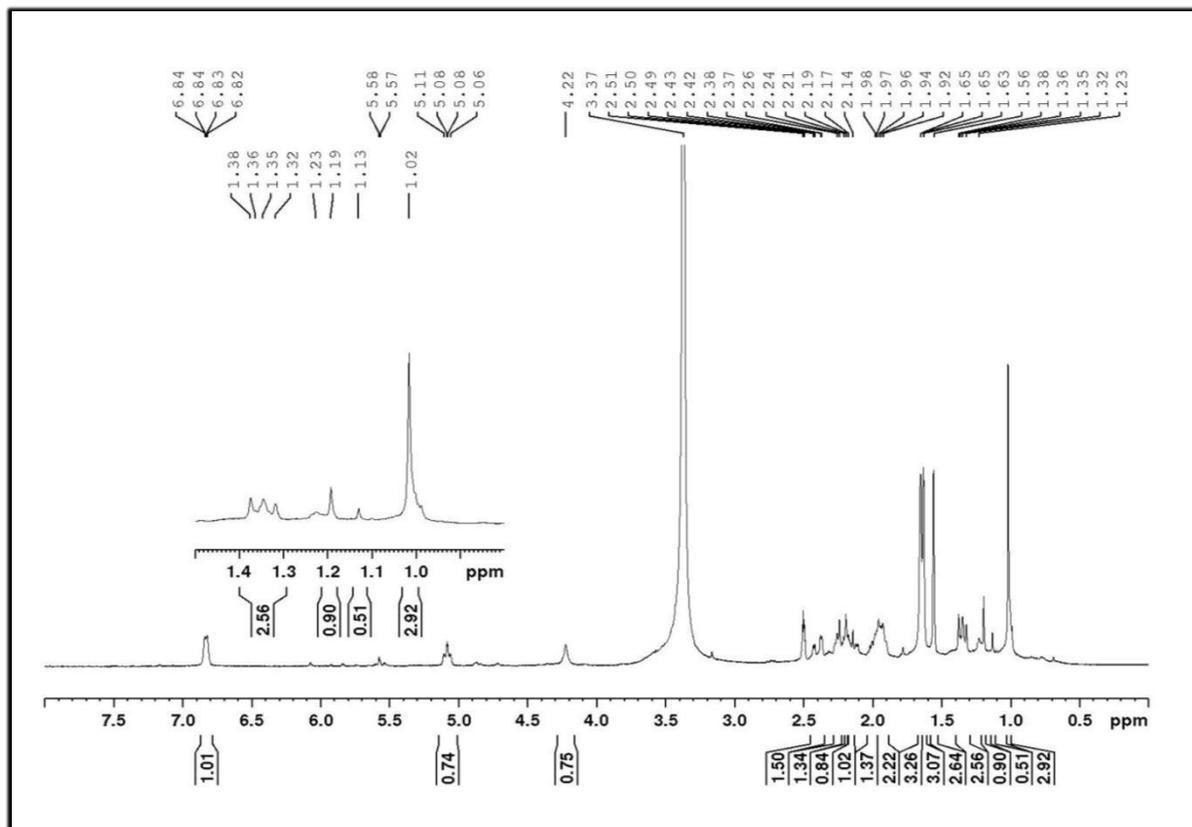
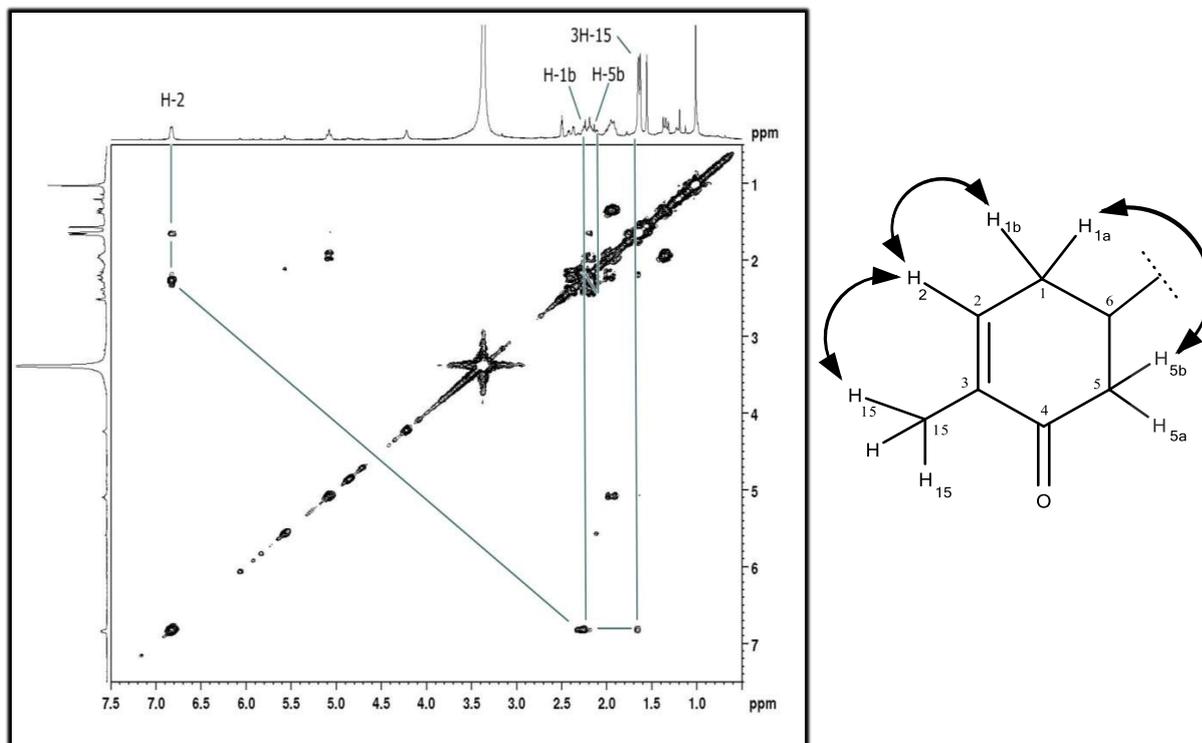
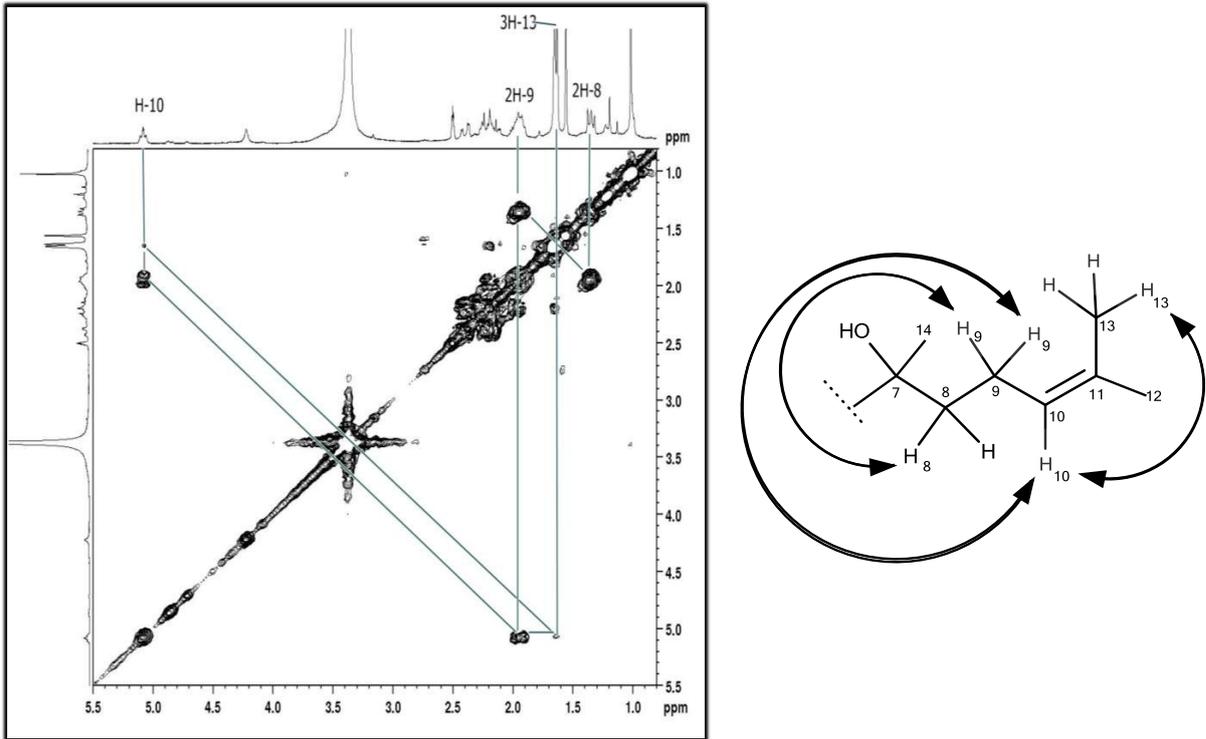


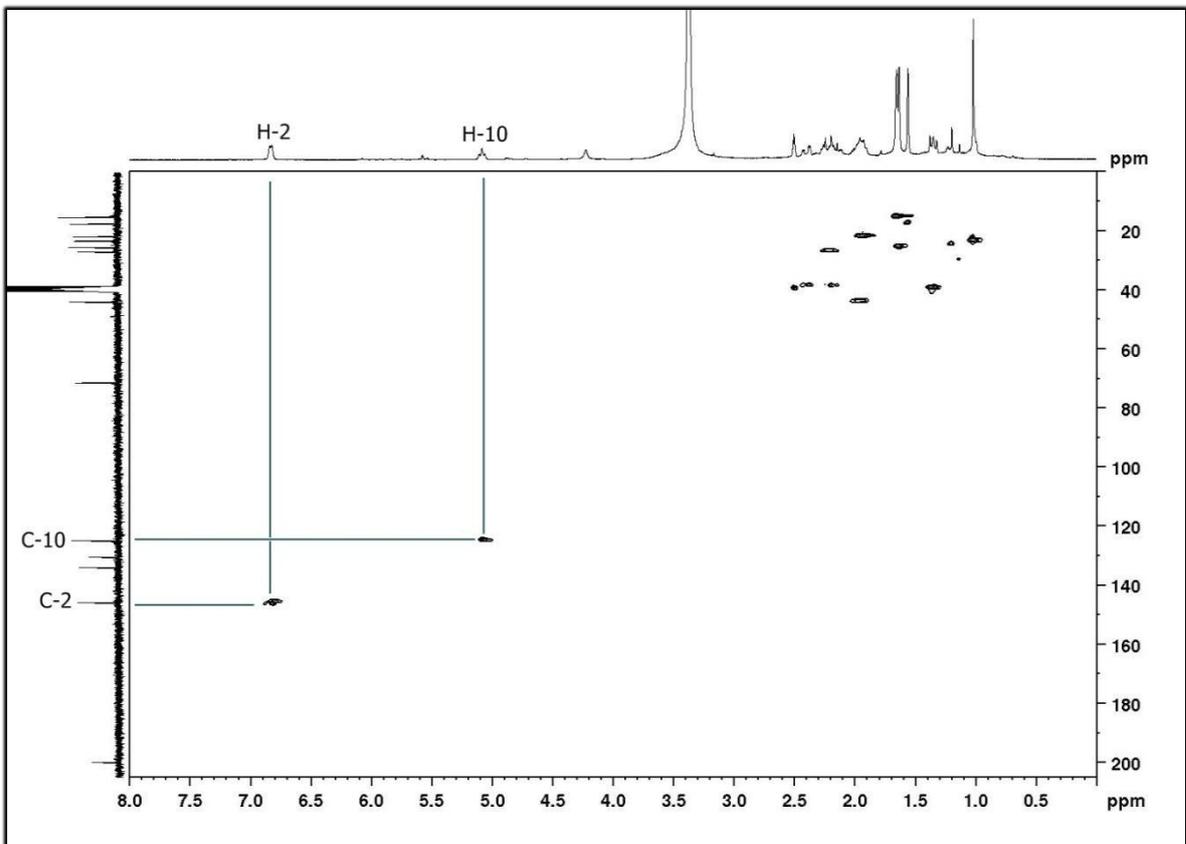
Figura 42: Espectro de RMN COSY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de CV-04



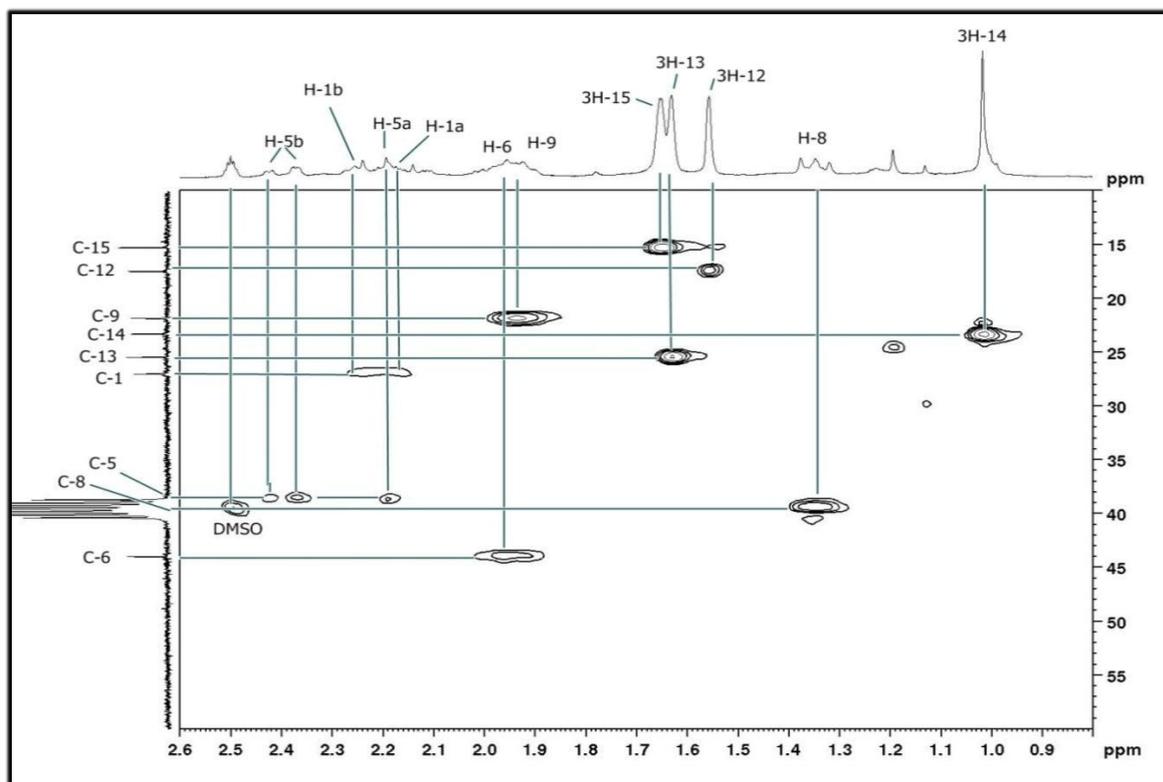
**Figura 43:** Espectro de RMN COSY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Expansão)



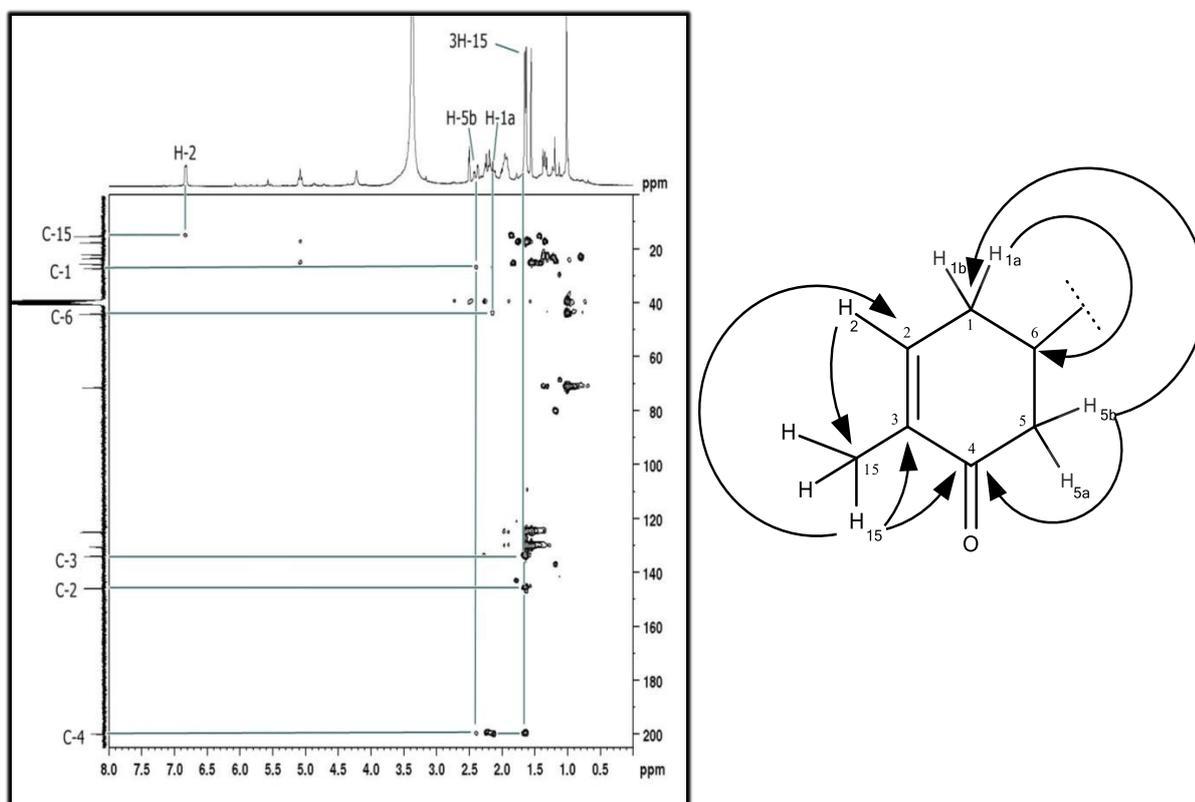
**Figura 44:** Espectro de RMN HSQC 2D  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (300 x 75MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04



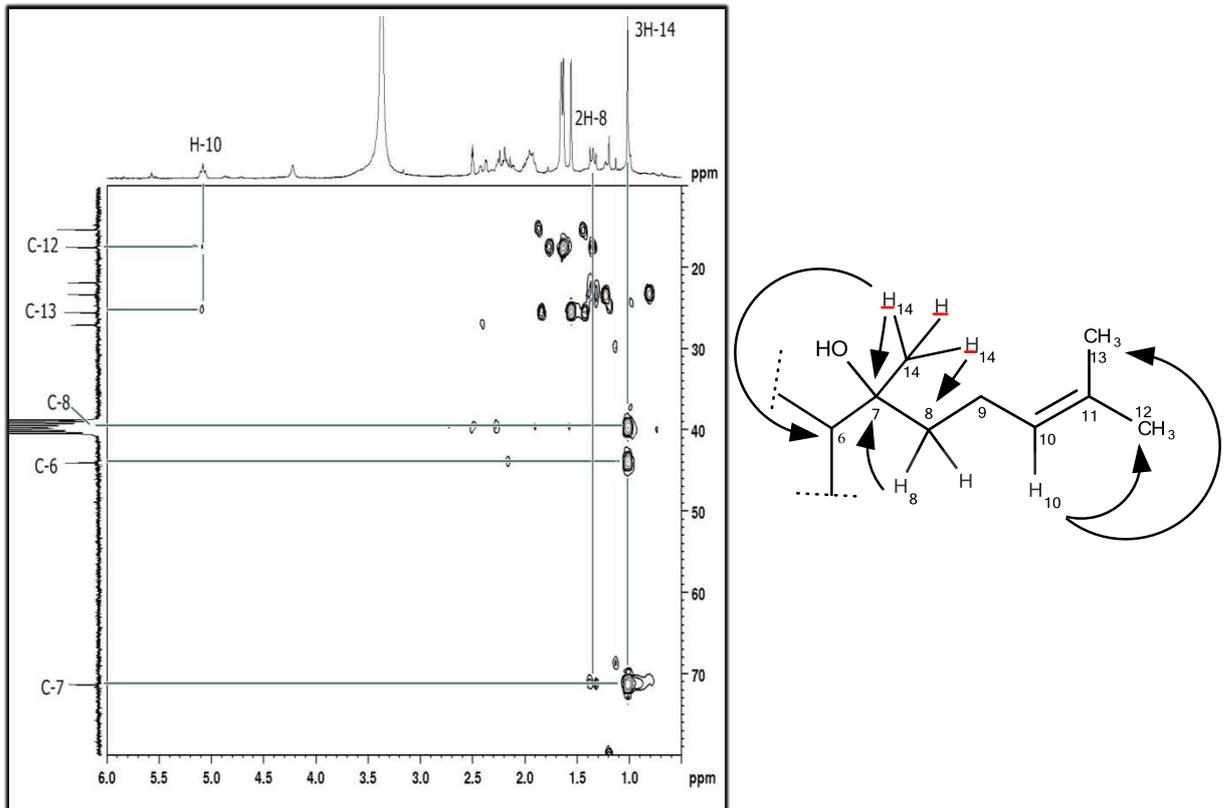
**Figura 45:** Espectro de RMN HSQC 2D  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (300 x 75MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04 (Expansão)



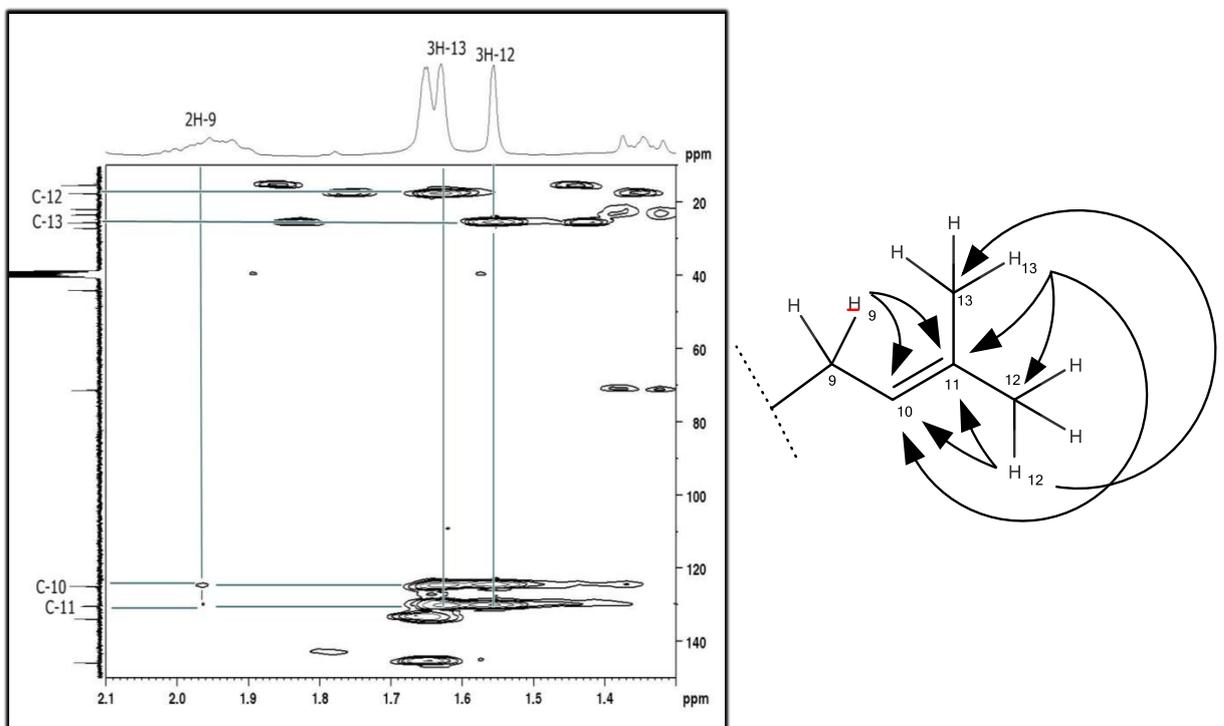
**Figura 46:** Espectro de RMN HMBC 2D  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (300x75MHz, DMSO- $d_6$ ) de CV-04



**Figura 47:** Espectro de RMN HMBC 2D  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  (300x75MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de CV-04 (Expansão)



**Figura 48:** Espectro de RMN HMBC  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  (300x75MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de CV-04 (Expansão 2)



#### 4.5 Determinação estrutural de CV-05

Após sucessivos procedimentos cromatográficos da fração CVET-DCM-1, originária do extrato etanólico dos talos de *Croton velutinus* utilizando gel de sílica, resultou no isolamento de 3,0 mg de uma resina de coloração amarelada  $[\alpha]_D -82,08^\circ \pm 0,52$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ;  $c$  0,1) denominada de CV-05 (Item 3.1.7, pág 37).

O espectro na região do infravermelho de CV-05 (Figura 51, pág 86), apresentou duas bandas em  $1770\text{ cm}^{-1}$  e em  $1694\text{ cm}^{-1}$  podendo ser compatíveis com carbonilas de éster e de ácido carboxílico respectivamente, duas bandas em  $1413\text{ cm}^{-1}$  e  $1383\text{ cm}^{-1}$  podendo ser referentes à deformação angular C-H e uma banda em  $1023\text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de ligação C-O.

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 53, pág. 87) de CV-05 mostrou a presença de 5 absorções atribuídas a carbonos não hidrogenados (C), 3 carbonos monoidrogenados (CH), 6 carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e 2 carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

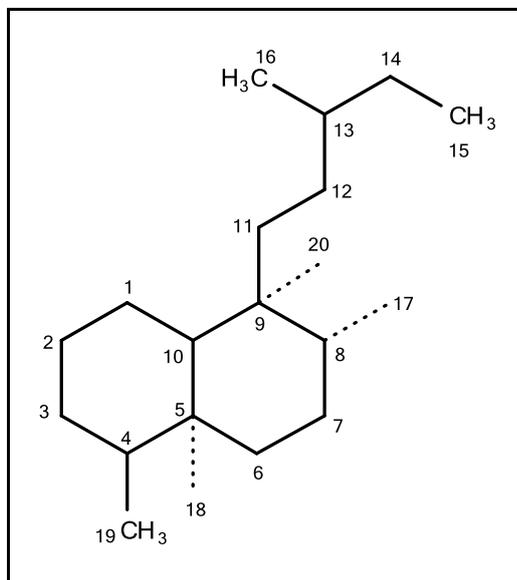
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Figura 52, pág 87), revelou 16 linhas espectrais, sendo duas delas características de carbonila, uma em  $\delta_C$  177,0 correspondente a uma carbonila de éster e outra em  $\delta_C$  171,4 atribuída a uma carbonila conjugada de ácido carboxílico. Foram observadas duas linhas espectrais na região de carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta_C$  140,7 e 139,6, uma absorção na região de carbonos oxigenados em  $\delta_C$  69,2 e ainda onze sinais na região de carbonos  $\text{sp}^3$  em  $\delta_C$  49,0, 45,7, 42,9, 39,9, 37,8, 35,2, 27,6, 27,3, 19,6, 18,7 e 16,5.

De acordo com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Figura 54, pág 88) foi observado um sinal na região característica de hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta_H$  6,91 (dd,  $J = 4,5\text{ Hz}$ ;  $3,6\text{ Hz}$ , H-3) e dois sinais em  $\delta_H$  4,11 (d,  $J = 9,8\text{ Hz}$ , Ha-20) e em  $\delta_H$  4,19 (d,  $J = 9,8\text{ Hz}$ , Hb-20) que pelo deslocamento possivelmente estão próximos a átomos eletronegativos. Observam-se ainda sinais em  $\delta_H$  2,78 (d,  $J = 18,5\text{ Hz}$ , Ha-11) e  $\delta_H$  2,19 (d,  $18,5\text{ Hz}$ , Hb-11), além de outros multipletos em  $\delta_H$  2,49 (m, Ha-6), 1,24 (m, Hb-6),  $\delta_H$  2,41 (m, 2H-2),  $\delta_H$  1,78 (m, Ha-1), 1,55 (m, Hb-1),  $\delta_H$  1,51 (m, H-10),  $\delta_H$  1,49 (m, Ha-7), 1,44 (m, Hb-7),  $\delta_H$  1,46 (m, H-8) e dois sinais com integração para três hidrogênios cada em  $\delta_H$  1,11 (s, 3H-18) e em  $\delta_H$  0,98 (d,  $J = 6,1\text{ Hz}$ , 3H-17).

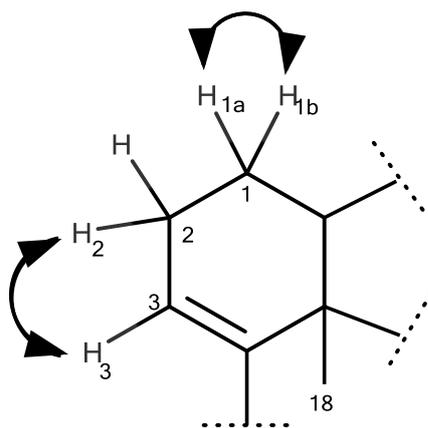
Analisando os dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ , pela presença de 6 carbonos metilênicos e das carbonilas de éster e de

ácido carboxílico, pode CV-05 possuir esqueleto base semelhante a de um diterpeno clerodano (Figura 49).

**Figura 49:** Esqueleto tipo clerodano



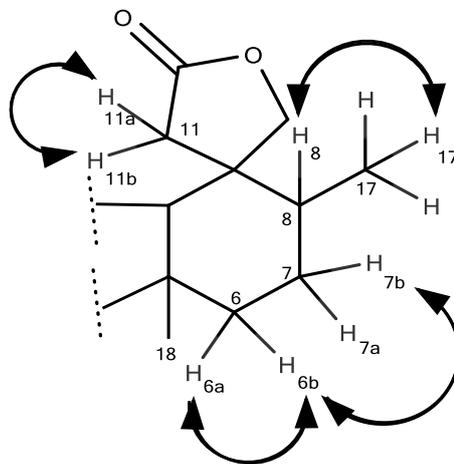
No espectro de correlação homonuclear COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Figura 55, pág 88), são observadas as correlações do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,78 (m, Ha-1) com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,55 (m, Hb-1) e do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (dd, H-3) ligado a carbono olefínico com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,41 (m, 2H-2) (subestrutura 19).



Subestrutura 19

Ainda no espectro de COSY (Figura 56, pág 89) foram observados acoplamentos geminais ( $^2J$ ) dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,49 (m, Ha-6) e 1,24 (m, Hb-6), e dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,78 (d, Ha-11) e  $\delta_{\text{H}}$  2,19 (d, Hb-11) sendo provavelmente diastereotópicos. Observa-se

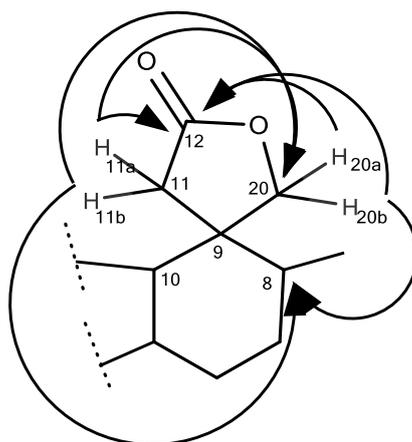
também acoplamento vicinal ( $^3J$ ) do hidrogênio em  $\delta_H$  1,44 (m, Hb-7) com o hidrogênio em  $\delta_H$  1,24 (m, Hb-6) e os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  0,98 (d, 3H-17) com o hidrogênio em  $\delta_H$  1,46 (m, H-8) (subestrutura 20).



Subestrutura 20

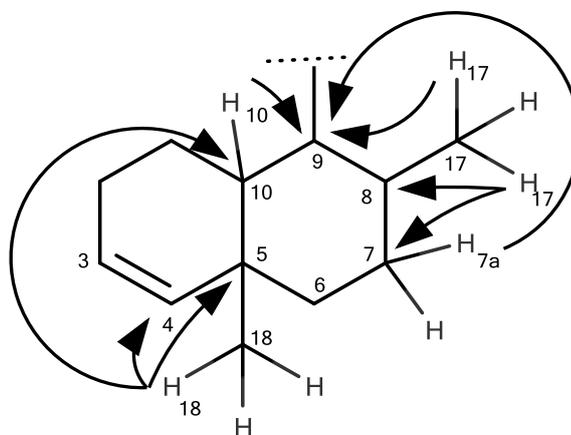
O diagrama de contorno RMN 2D HSQC  $^1H \times ^{13}C$  (500x125 MHz,  $CDCl_3$ ) de CV-05 (Figuras 57 e 58, pág 89 e 90), revelou os acoplamentos (C-H) a uma ligação, relacionando os hidrogênios a seus respectivos carbonos, assim como sinais de hidrogênios diferentes acoplado com mesmo carbono, corroborando para a presença de hidrogênios diastereotópicos .

De acordo com o espectro de correlação heteronuclear a duas ou mais ligações RMN 2D HMBC  $^1H \times ^{13}C$  (500x125 MHz,  $CDCl_3$ ) de CV-05 (Figura 59, pág 90), foram observadas as correlações dos hidrogênios com os carbonos a duas ( $^2J$ ) e três ( $^3J$ ) ligações. Os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  4,19 (d, Ha-20) e 4,11 (d, Hb-20) correlacionam com os carbonos em  $\delta_C$  177,0 (C-12) e 43,0 (C-8) e os hidrogênios em  $\delta_H$  2,78 (d, Ha-11) e 2,19 (d, Hb-11) com os carbonos em  $\delta_C$  177,0 (C-12), 69,2 (C-20) e 43,0 (C-8) (subestrutura 21).



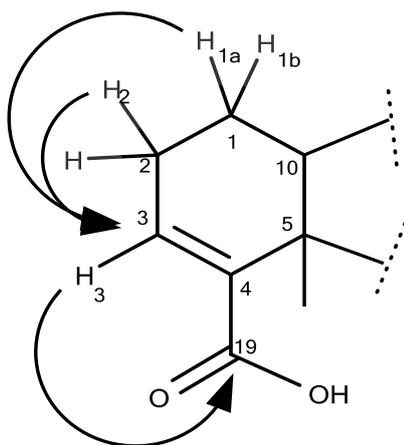
Subestrutura 21

O espectro de HMBC (Figura 60, pág 91) revelou as correlações dos hidrogênios da metila em  $\delta_H$  0,98 (d, 3H-17) com os carbonos em  $\delta_C$  45,7 (C-9), 43,0 (C-8) e 27,3 (C-7), e dos hidrogênios em  $\delta_H$  1,51 (m, H-10) e 1,48 (m, Ha-7) com o carbono em  $\delta_C$  45,7 (C-9) como também dos hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,11 (s, 3H-18) com os carbonos em  $\delta_C$  139,6 (C-4), 49,1 (C-10) e 37,8 (C-5) (subestrutura 22).



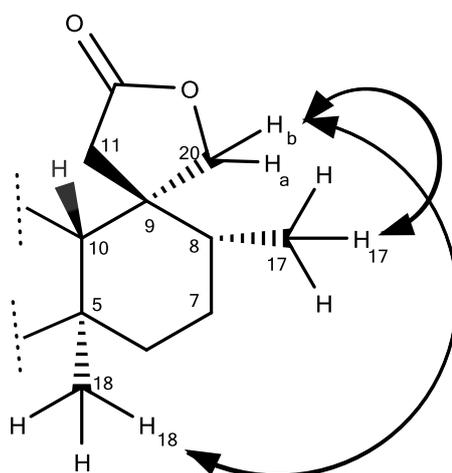
Subestrutura 22

Ainda no espectro HMBC (Figura 61, pág 91) de CV-05, observa-se a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,91 (dd, H-3) com o carbono da carbonila em  $\delta_C$  171,4 (C-19), dos hidrogênios em  $\delta_H$  2,41 (m, 2H-2) com o carbono olefínico em  $\delta_C$  140,7 (C-4), além do hidrogênio em  $\delta_H$  1,78 (m, Ha-1) com o carbono olefínico em  $\delta_C$  139,6 (C-3) (subestrutura 23).



Subestrutura 23

O espectro de correlação homonuclear RMN NOESY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 62, pág 92) comparado com o COSY 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 55, pág 88) de CV-05, permitiu a determinação da estereoquímica relativa de CV-05 o qual revelou o acoplamento espacial entre os hidrogênios das metilas em  $\delta_{\text{H}}$  0,98 (d, 3H-17) e em  $\delta_{\text{H}}$  1,11 (s, 3H-18), com os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,19 (d, Ha-20) e 4,11 (d, Hb-20), corroborando com uma estrutura de um anel de decalina ligado a uma furanolactona (subestrutura 24).

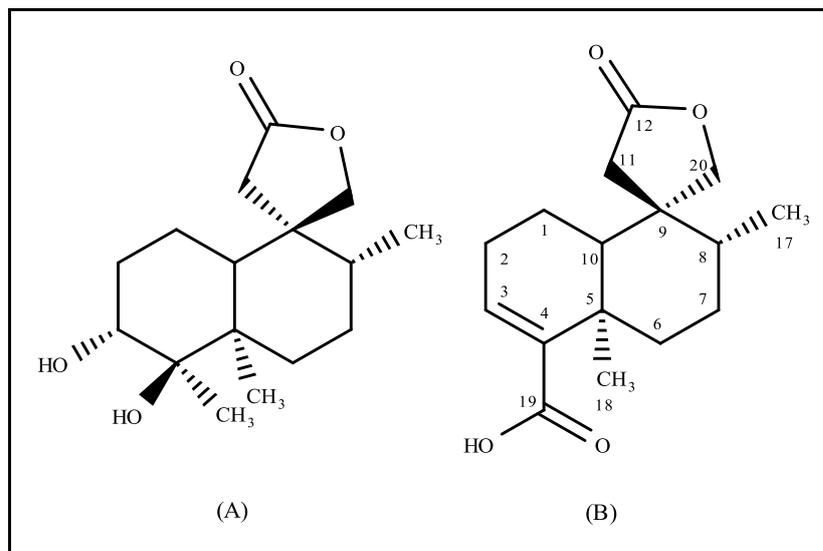


Subestrutura 24

De acordo com as informações obtidas, CV-05 se trata de um diterpeno clerodano com 16 carbonos inédito na literatura, denominado de Ácido velutinóico (5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*)-2', 4*a*'-dimetil-5-oxo-3', 4, 4', 4*a*', 7, 7', 8', 8*a*'-octahidro-2'*H*-espiro[furan-3, 1'-naftaleno]-5'-ácido

carboxílico. (Figura 50B). Um composto com estrutura semelhante, foi isolado por Graikou *et al.*, (2005) das partes aéreas de *Croton insularis*, composto denominado de Crotinsulactona ( $2'R^*,3R^*,4a'R^*,5'R^*,6'R^*,8a'R$ )-Octahidro-5',6'-diidroxí-2',4a',5'-trimetil-2'H-spiro[furan-3,1'-naftalen]-5(4*H*)-ona (Figura 50A). Os dados de CV-05 foram comparados com os da Crotinsulactona (Tabela 16, pág 86).

**Figura 50:** Estruturas dos compostos Crotinsulactona (A) e Ácido velutinóico (B).

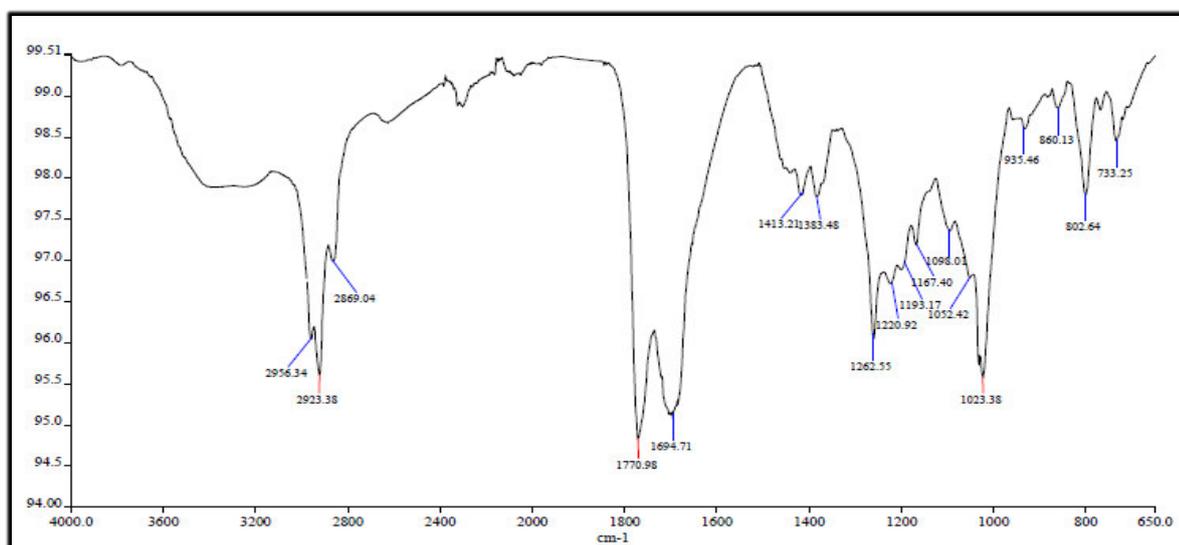


**Tabela 16:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlações de HSQC e HMBC ( $^2J$  e  $^3J$ ) ( $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05, comparado com valores da literatura de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

C	HSQC		HMBC		Crotinsulactona*	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$^2J$	$^3J$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
1	18,7	1,59 (m); 1,79 (m)	-	H-3	19,1	1,48 (d); 1,77-1,62(m)
2	27,6	2,41 (m)	-	-	31,5	2,05 (t); 1,77-1,62(m)
3	140,7	6,92 dd (4,55; 3,65)	H-3	-	77,2	3,50 (s)
4	139,6	-	Hb-2	3H-18	77,1	-
5	37,8	-	-	-	43,1	-
6	35,2	1,25 (m); 2,49 (m)	-	-	33,8	1,77-1,62 (m)
7	27,3	1,44 (m); 1,49 (m)	-	3H-17	28,0	152-1,36 (m)
8	42,9	1,46 (m)	3H-17	Ha-20; Hb-20 Ha-11; Hb-11	44,3	- 1,52-1,36 (m)
9	45,7	-	H-10	3H-17	47,5	1,52-1,36 (m)
10	49,1	1,51 (m)	-	Ha-11; 3H-18	44,3	1,93 (d)
11	39,9	2,21 d (18,5); 2,80 d (18,5)	-	-	41,3	2,87d,(18,5);2,15d (18,5)
12	177,0	-	Ha-11; Hb-11	Ha-20; Hb-20	180,0	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	16,5	0,98 d (6,15)	-	-	17,4	0,92 d (6,0)
18	19,6	1,11 (s)	-	-	17,4	1,19 (s)
19	171,4	-	-	H-3	21,6	-
20	69,2	4,11 d (9,8); 4,19 d (9,8)	-	Hb-11; H-10	71,4	4,25 d (10,0);4,19 d (10,0)

\*(GRAIKOU, *et al.*, 2005)

**Figura 51:** Espectro de absorção no infravermelho de CV-05



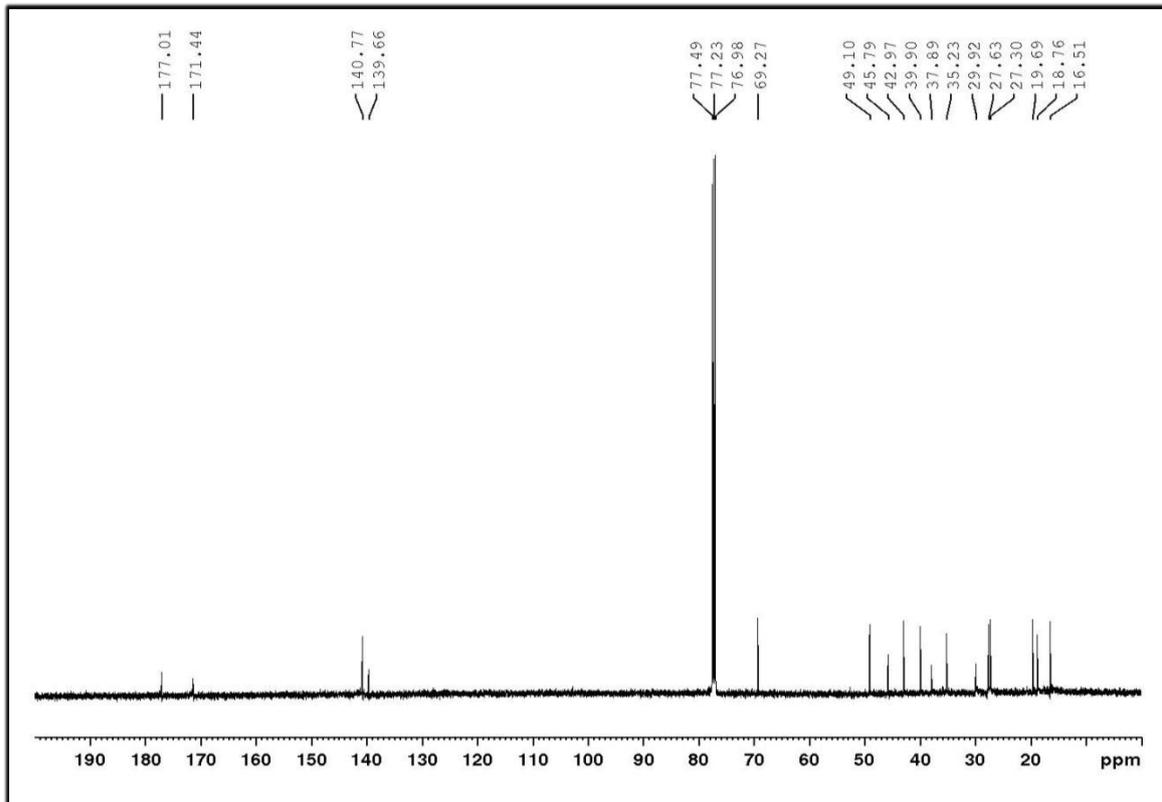
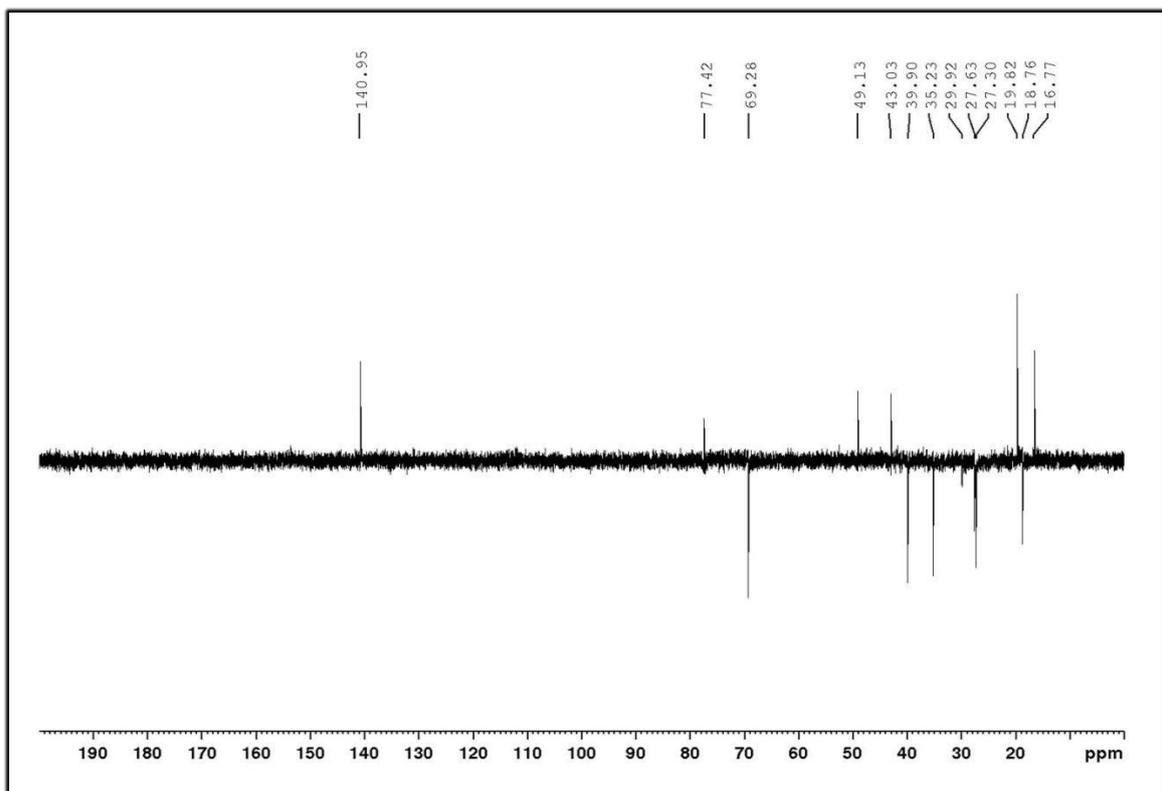
**Figura 52:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05**Figura 53:** Espectro de RMN DEPT 135° (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05

Figura 54: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05

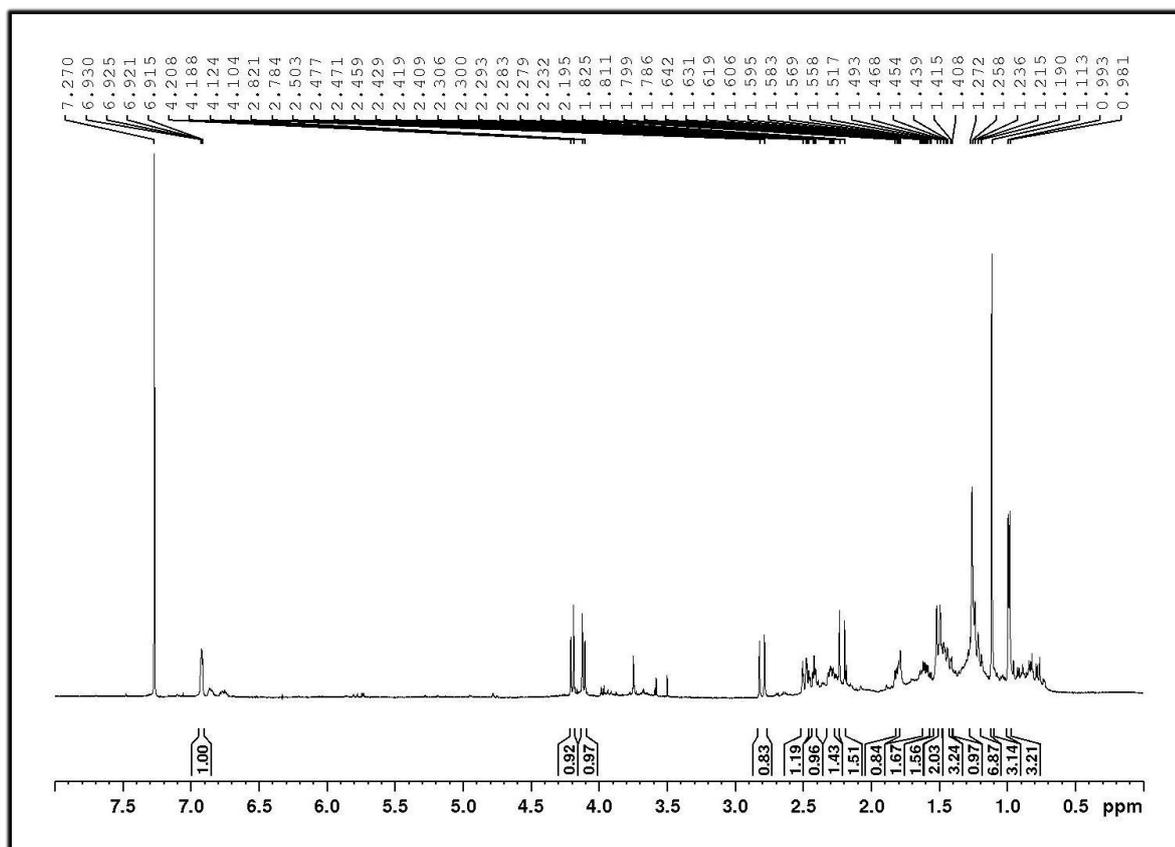
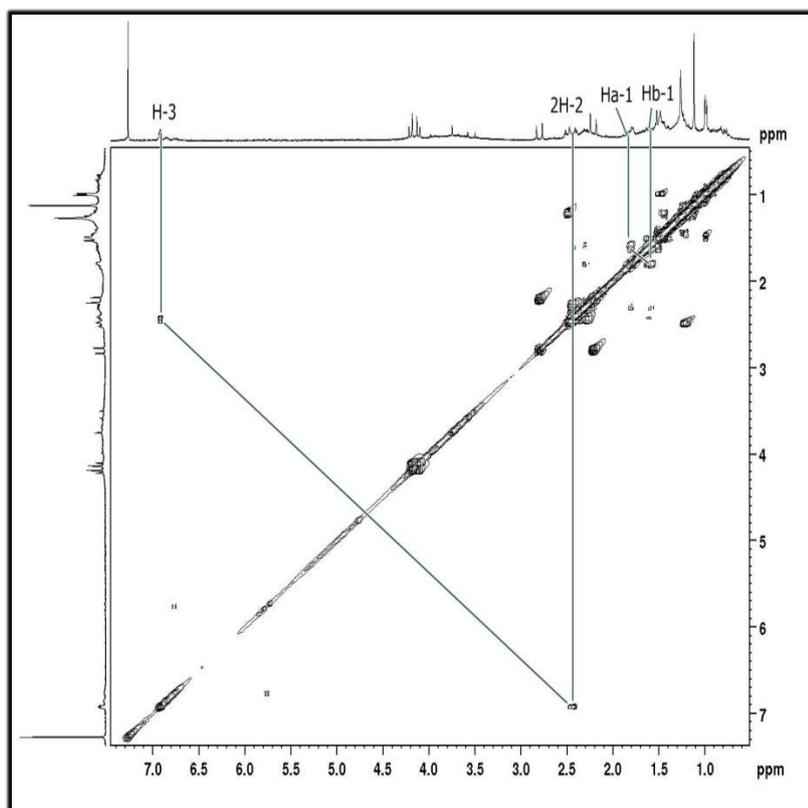
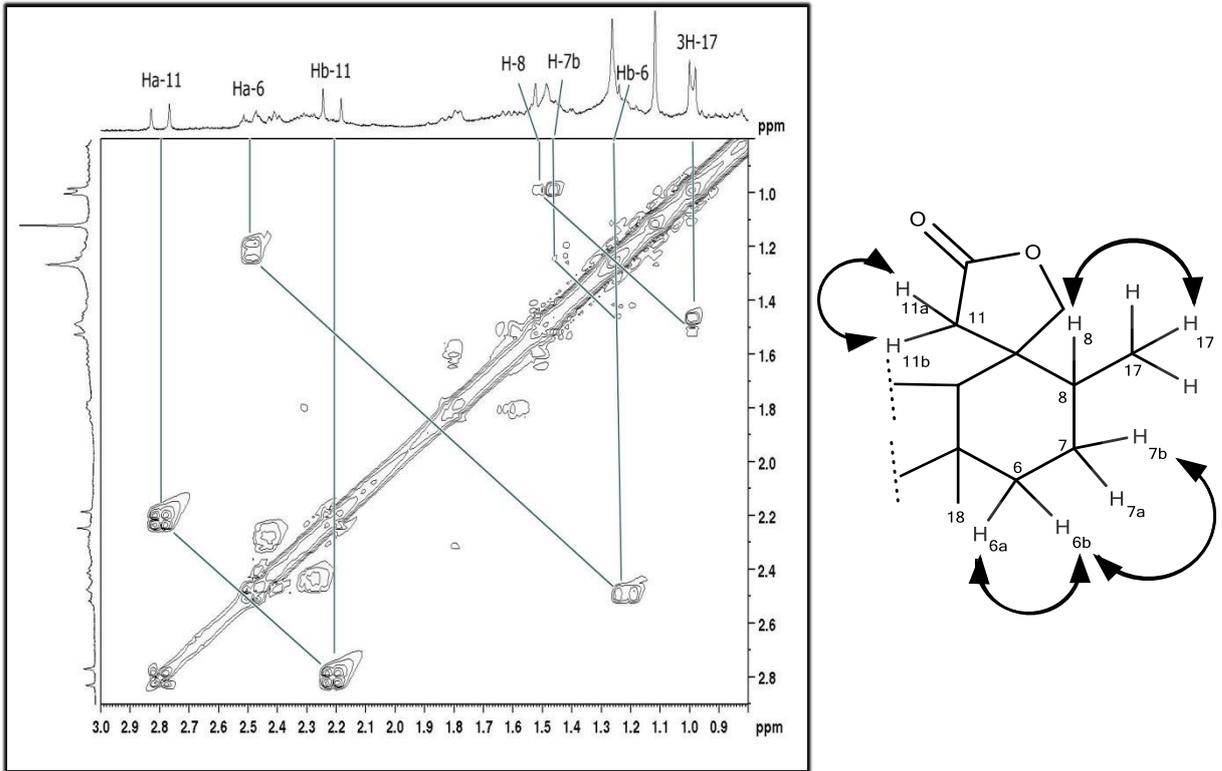


Figura 55: Espectro de RMN 2D COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05



**Figura 56:** Espectro de RMN 2D COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)



**Figura 57:** Espectro de RMN HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05

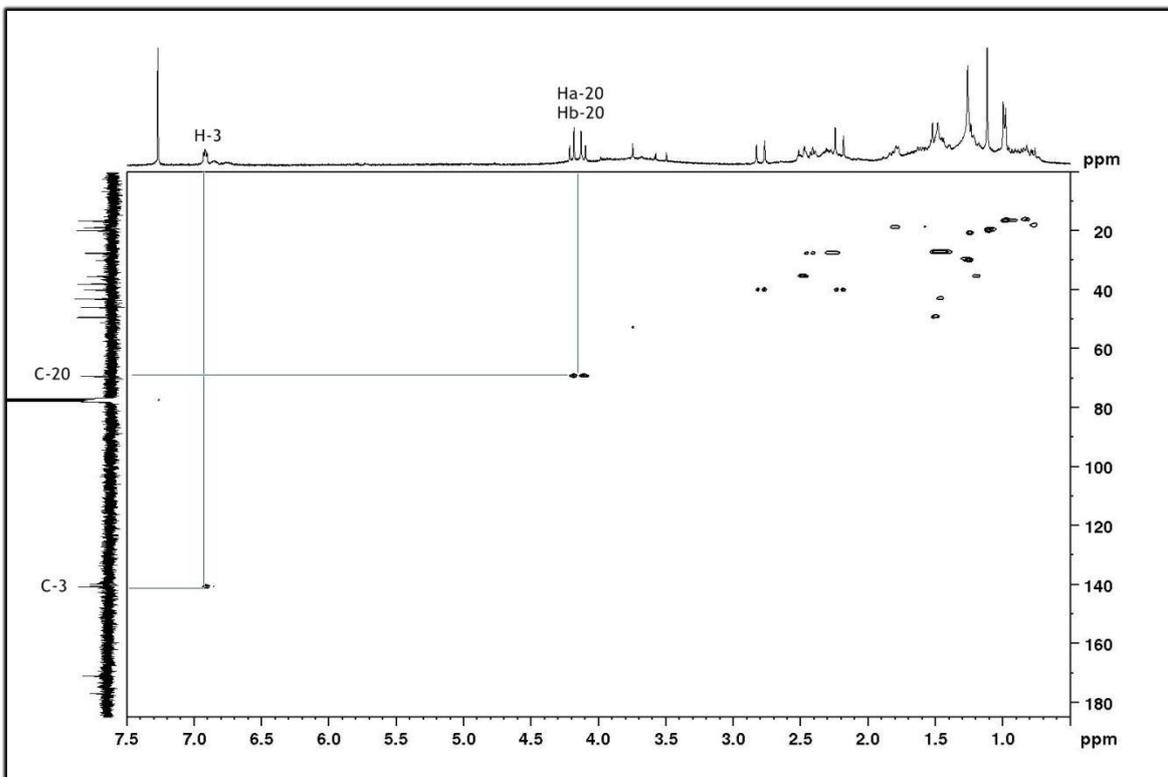


Figura 58: Espectro de RMN HSQC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)

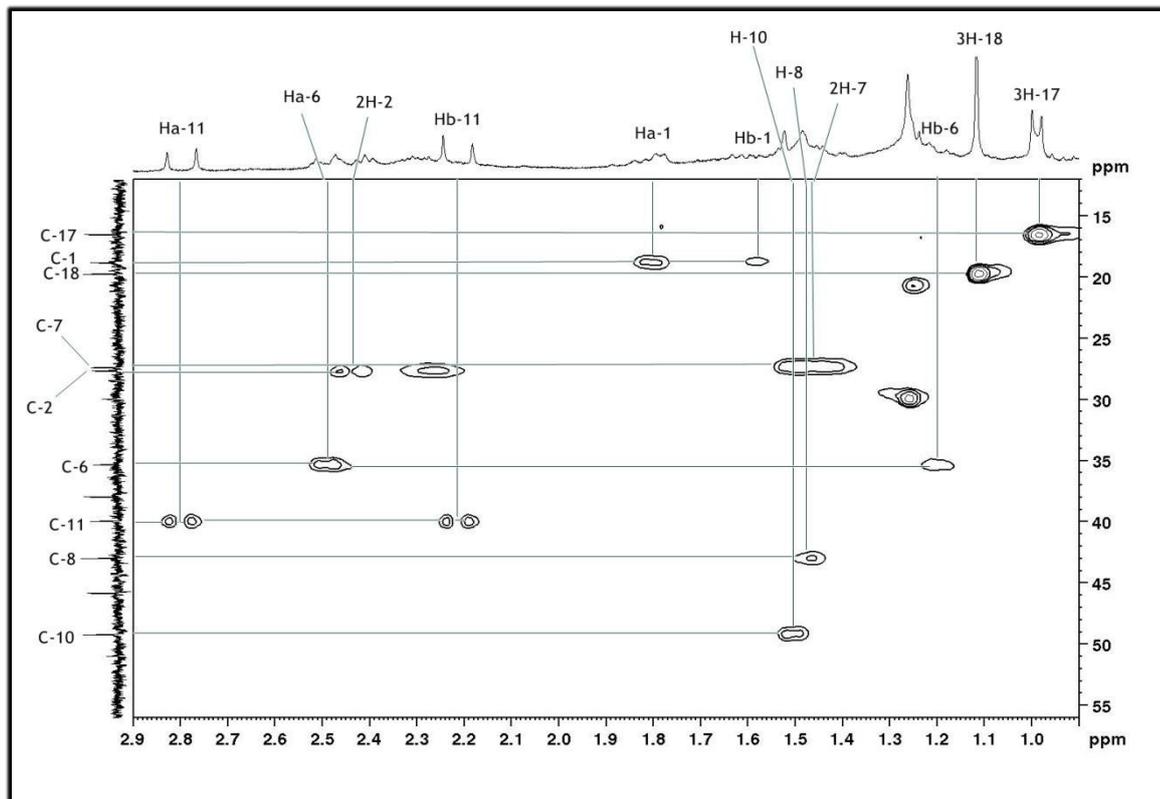
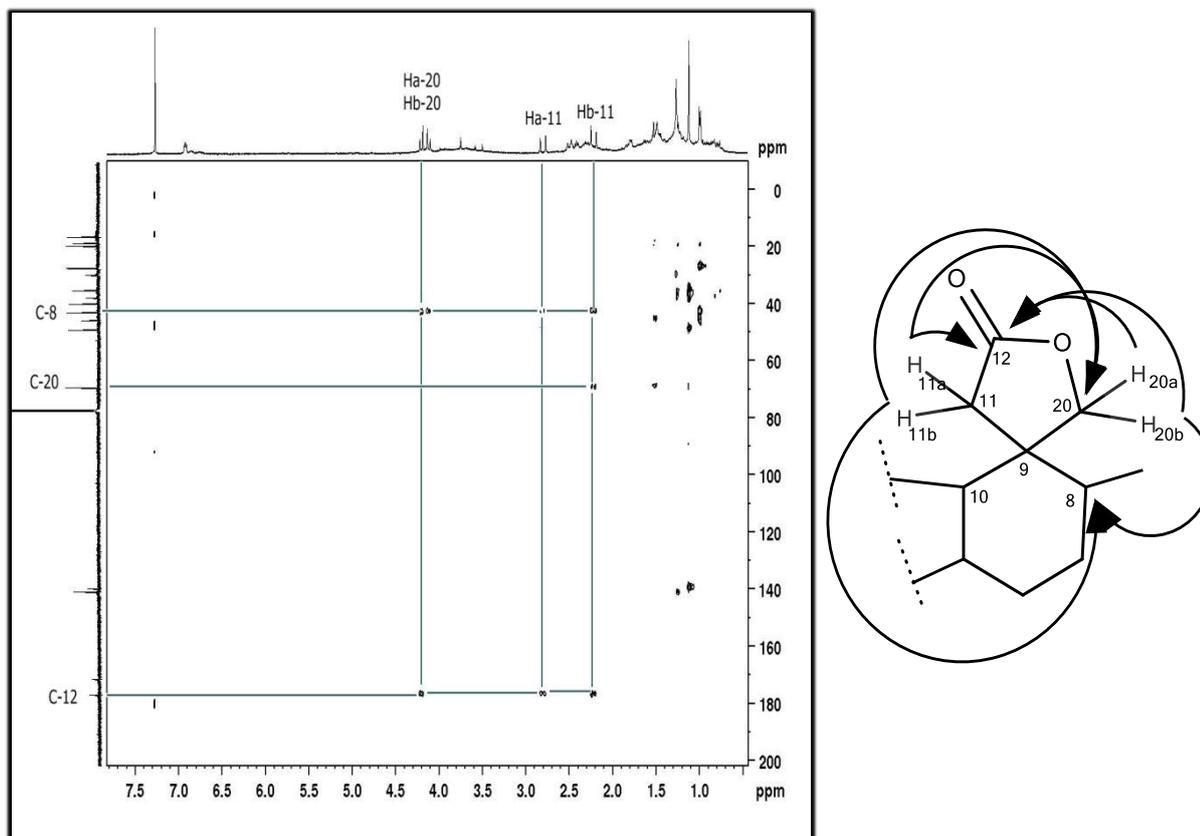
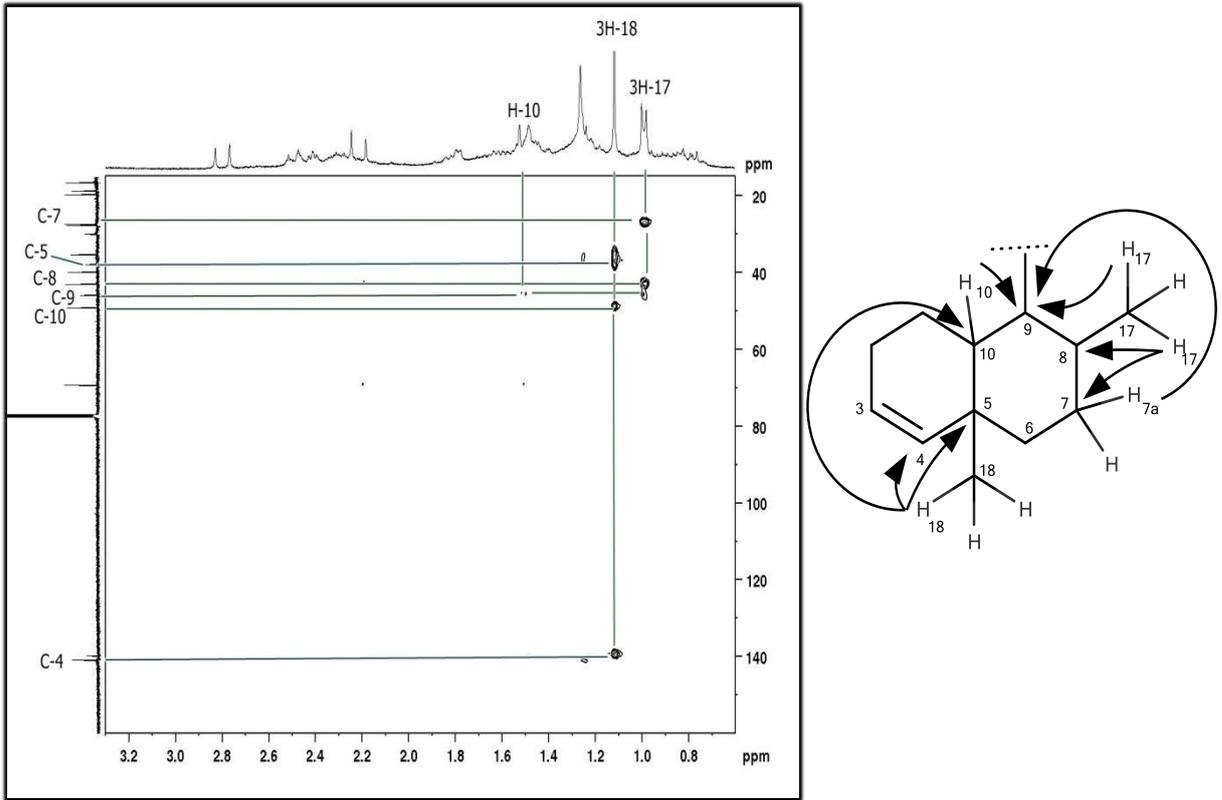


Figura 59: Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05



**Figura 60:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão)



**Figura 61:** Espectro de RMN 2D HMBC  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (500x125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05 (Expansão 2)

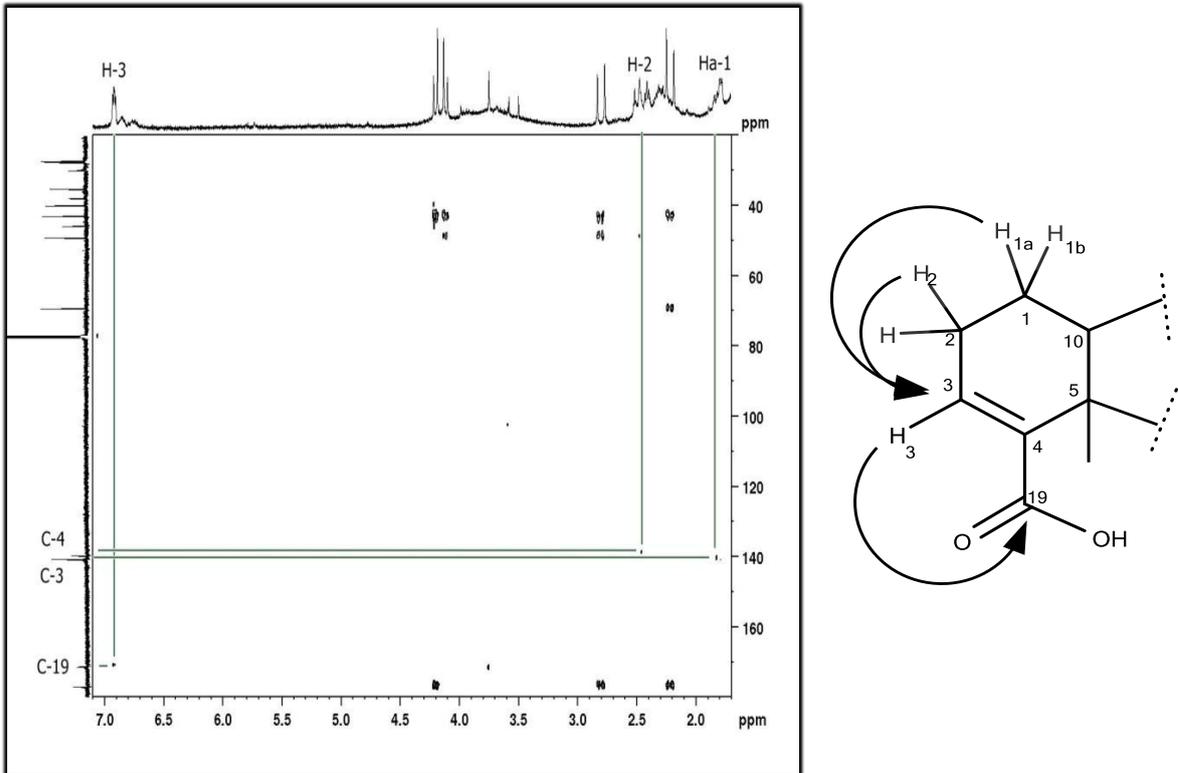
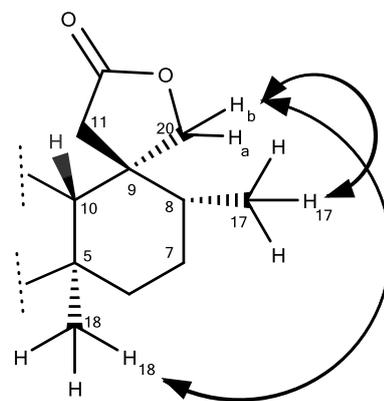
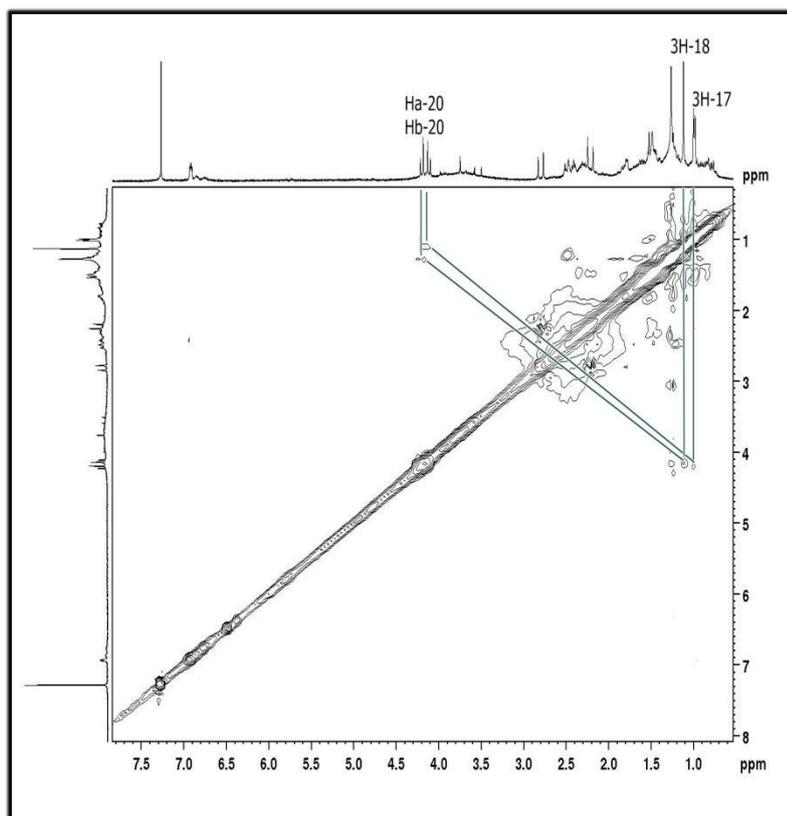


Figura 62: Espectro de RMN 2D  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  NOESY (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CV-05



## 5.0 ATIVIDADES REALIZADAS COM OS EXTRATOS DE *Croton velutinus*

### 5.1 Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase

Os extratos etanólico e hexânico dos talos de *Croton velutinus* assim como as frações obtidas dos mesmos foram submetidas à avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, relacionada às causas do mal de Alzheimer. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela pesquisadora Dra. Irvila Ricarte, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra Maria Teresa Salles Trevisan.

A deficiência de diversos neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, serotonina e noradrenalina, está associada à doença de Alzheimer, e os fármacos atualmente vendidos apresentam preços onerosos. A utilização de plantas medicinais encoraja a pesquisa em busca de meios alternativos para o tratamento da doença (TREVISAN e MACEDO, 2003).

A maioria dos compostos que possuem atividade de inibição relevante são primariamente de plantas, quando comparados a organismos marinhos e pesquisas microbiais, sendo os alcaloides os que se mostraram mais eficientes (WILLIAMS *et al.*, 2011).

O ensaio é baseado em procedimento descrito por Ellman *et al.*, (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.*, (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5 µl dos extratos na concentração 10 mg/ml para extratos e aplicar em uma cromatoplaça de metal. Após a evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L<sup>-1</sup> com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 –nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L<sup>-1</sup>), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (3U/ml). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desaparece. Como controle positivo, foi utilizado solução do padrão sal de Eserina (2mg/ml) como controle positivo, e como controle negativo, foram utilizados solventes.

Algumas das frações obtidas dos extratos dos talos de *Croton velutinus* apresentaram relevante atividade inibidora. O extrato hexânico CVHT apresentou inibição próxima ao padrão, enquanto o extrato etanólico não apresentou inibição. As frações CVHT-H e CVHT-

DCM-1, mostraram resultados superiores de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) aos do padrão Eserina, enquanto as frações CVHT-Ac e CVHT-MeOH mostraram a mesma eficiência. As amostras CVHT-DCM-2, CVET-E e CVET-HA mostraram atividade de inibição, porém abaixo do padrão. As demais frações não mostraram a presença de halos brancos indicando que os extratos não possuem ação inibitória sobre a enzima de AChE, apresentando dessa forma resultado negativo (Tabela 17).

**Tabela 17:** Amostras de *Croton velutinus* submetidas ao ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase

<b>Amostras</b>	<b>Resultado</b>	<b>Tamanho do halo (mm)</b>
Padrão positivo (Eserina)	Positivo	12
Padrão negativo	-	**
CVET	Negativo	**
CVHT	Positivo	11
CVHT-H	Positivo	15
CVHT-D1	Positivo	15
CVHT-D2	Positivo	9
CVHT-Ac	Positivo	12
CVHT-MeOH	Positivo	12
CVET-H	Negativo	**
CVET-D1	Negativo	**
CVET-D2	Negativo	**
CVET-Ac	Negativo	**
CVET-E	Positivo	10
CVET-HÁ	Positivo	10

\*\* Não apresentou formação de “halo” de inibição

## 5.2 Ensaio de atividade antioxidante por sequestro de radicais DPPH

Esta pesquisa foi realizada no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará pela Prof<sup>a</sup> Dra Tamara Gonçalves Araújo.

A medida da atividade sequestradora do radical DPPH dos extratos etanólico e hexânico de *Croton velutinus* (CVHT e CVET) e de suas frações, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset, (1995). A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL dos extratos e suas frações, 3 mL de etanol e 0,3 mL da

solução 0,5 mM do radical DPPH em etanol. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 517 nm (UV mini 1240), após 45 min. As amostras e as substâncias de referência, butil-hidroxitolueno (BHT),  $\alpha$ -tocoferol e butil-hidroxianisol (BHA) foram avaliadas na concentração final de 90  $\mu$ g/mL. A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH-amostras e padrões, após 45 min de reação (fase estável) em relação à solução de referência (DPPH em etanol), de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100 - ((A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) * 100) / A_{\text{controle}}$$

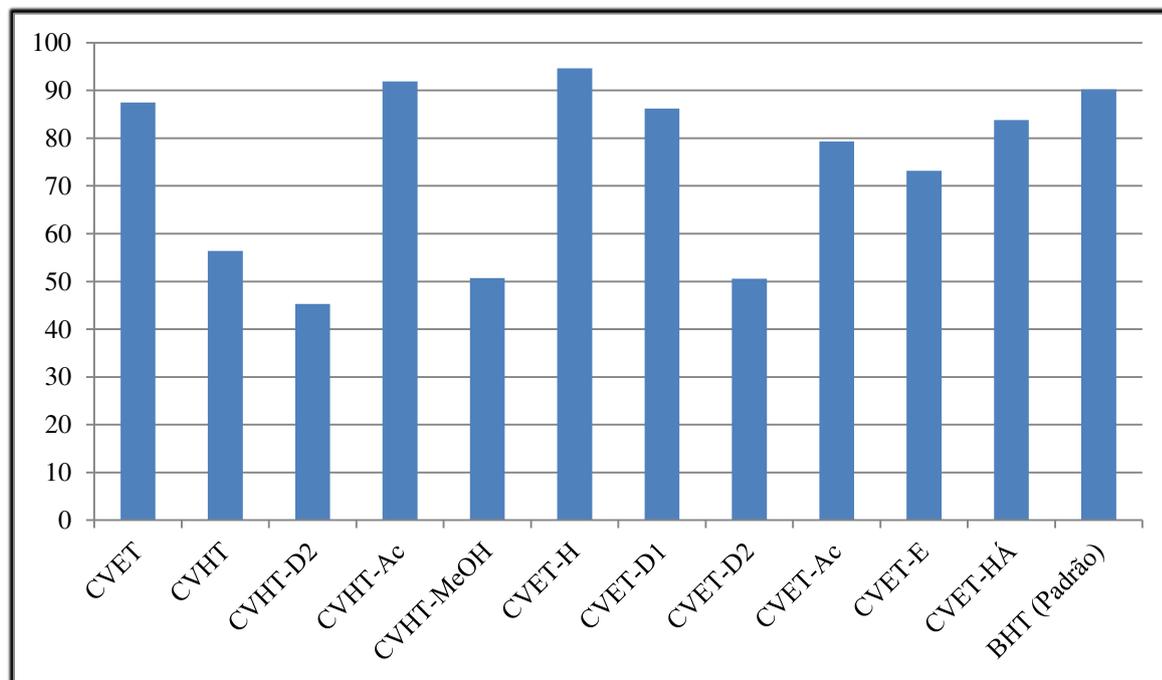
onde:  $A_{\text{amostra}}$  = absorbância da solução DPPH (amostras);  $A_{\text{branco}}$  = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH;  $A_{\text{controle}}$  = absorbância da solução de referência de DPPH (etanol).

O organismo utiliza diversos agentes antioxidantes para prevenir e amenizar processos oxidativos, estruturas que geralmente apresentam grupos fenólicos, que são consideradas as que apresentam as principais funções responsáveis pelo impedimento da formação de radicais livres (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Muitas substâncias captadoras de espécies reativas de oxigênio têm sido obtidas a partir de plantas (GULÇIN, *et al.*, 2003), e os estudos de flavonóides, sendo compostos fenólicos, revelam os mesmos como eficientes captadores radicalares, através do uso do método de radical estável DPPH (LI, *et al.*, 2009).

Analisando o gráfico da figura 63 e a tabela 18 (pág 96), os vários valores de porcentagem de inibição de DPPH, quanto maior o valor, maior será a capacidade antioxidante do extrato/fração, porque maior será a atividade de sequestro do radical livre DPPH. As amostras CVET-H e CVHT-Ac apresentaram valores de inibição do radical livre DPPH superiores aos do padrão BHT, e as amostras CVHT, CVHT-MeOH, CVHT-DCM-2 e CVET-DCM-2 apresentaram baixos valores de inibição. As demais amostras, embora inferiores ao padrão BHT, ainda sim apresentaram altos valores de inibição.

**Tabela 18:** Valores de porcentagem de inibição do radical DPPH dos extratos de *Croton velutinus*

Amostras	Inibição de DPPH (%)
CVET	87,5
CVHT	56,4
CVHT-D2	45,3
CVHT-Ac	91,9
CVHT-MeOH	50,7
CVET-H	94,6
CVET-D1	86,2
CVET-D2	50,6
CVET-Ac	79,3
CVET-E	73,2
CVET-HÁ	83,8
BHT (Padrão)	90,2

**Figura 63:** Porcentagem de inibição do radical DPPH dos extratos de *Croton velutinus*.

### 5.3 Atividade larvicida dos extratos de *Croton velutinus*

Os bioensaios para a determinação da atividade larvicida, frente às larvas do mosquito vetor da dengue *Aedes aegypti* foram realizados na Universidade Federal do Ceará (UFC), no laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia, sob a orientação da professora Dra. Maria Teresa Salles Trevisan e execução da bolsista pesquisadora Júnior Irvila Ricarte de Oliveira. As larvas foram cedidas pelo Núcleo de Vetores do Estado do Ceará (NUVET), em todas as etapas foram testadas as larvas de 3<sup>o</sup> estágio, sendo as larvas do tipo Rockefeller (isenta de contaminação).

Os extratos hexânico e etanólico de *Croton velutinus* tiveram sua atividade larvicida testada frente às larvas, segundo a metodologia utilizada por Cavalcanti *et al.* (2004), onde os extratos foram analisados em concentrações de 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 19). São adicionados 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) no extrato e completados com água até um volume de 20 mL. A essas soluções, foram adicionadas 20 larvas que, após um período de 24 e 72 horas foram recontadas e observadas o número de larvas mortas. O ensaio foi realizado em triplicata e calculado o valor da DL<sub>50</sub>. Paralelamente, foram realizados testes em branco, utilizando-se DMSO.

**Tabela 19:** Dados da mortalidade das larvas no 3<sup>o</sup> estágio de *Aedes aegypti* das amostras de *Croton velutinus*

Amostra	Concentração	Média da mortalidade (24 horas)	Média da mortalidade (72 horas)
Controle	-	0	2
CVHT-D1	-	NL*	NL*
CVHT-H	-	NL*	NL*
CVET-D1	-	NL*	NL*
CVET-H	-	NL*	NL*
CVHT-MeOH	-	NL*	NL*
CVHT-Ac	-	NL*	NL*
CVET-D2	-	NL*	NL*
CVET-E	1000 ppm	0	5
	500 ppm	0	4
	250 ppm	0	3
	200 ppm	0	1
	100 ppm	0	0
	50 ppm	0	0
CVET-Ac	-	NL*	NL*
CVET-HA	1000 ppm	0	4

NL\* = Não houve letalidade

Apesar de não ocorrer a letalidade das larvas, verificou-se que após 24 horas de exposição às larvas iniciaram a perda de mobilidade. O estado letárgico foi observado na exposição das larvas *Aedes aegypti* frente às frações CVHT-DCM-2 nas concentrações 1000-100ppm, CVHT-H nas concentrações (1000-250ppm), CVET-H (1000ppm) e CVET-Ac (1000-50ppm).

#### **5.4 Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE):**

Os inibidores da enzima conversora angiotensina (IECA), estão relacionados no tratamento da hipertensão reduzindo o risco de morbidade e de mortalidade mediante as lesões em órgãos-alvo que essas doenças podem ocasionar. O uso de inibidores é uma imprescindível ferramenta terapêutica sendo úteis na inibição da formação de angiotensina II e bloqueando o sistema renina-angiotensina. O captopril foi o primeiro inibidor descoberto e ainda é utilizado como droga anti-hipertensiva (BIONDO-SIMÕES, *et al.*, 2006).

O ensaio da inibição da enzima de conversão da angiotensina I foi realizado com o extrato etanólico dos talos de *Croton velutinus* (CVET), e com a substância CV-01 (Casticina) (Figura 4, pág 30) originada do mesmo extrato, seguindo a metodologia desenvolvida por Lahogue *et al.*, (2010). O substrato hipuril-histidil-leucina HHL (5 mmol/L, 2,15 mg/mL) foi dissolvido em 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8,3) contendo 0,3 mol/L NaCl. As soluções de extratos (10mg/mL) e compostos puros (1mg/mL) foram adicionadas as soluções de substrato (100µL) e incubados a 37°C por 10 min. A solução da enzima de ACE (200 milliunits/mL) em 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3 contendo 0,3 mol/L NaCl, adicionado e incubado a 37°C por 30min, com agitação contínua a 450 rpm. A reação é cessada ao adicionar HCl (100 µL).

O anti-hipertensivo Captopril foi usado como controle positivo na concentração de 2ng/mL e o metanol utilizado como controle negativo. A análise da mistura reacional em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi conduzida no aparelho Hewlett-Packard (HP) 1090, da seguinte forma: o detector UV foi ajustado a 228 nm, injeção de 5µL, fluxo 1mL/min. e pressão máxima de 400bar, com um tempo de 17 minutos de corrida, utilizando o seguinte gradiente de eluição: Eluente (A): 0,05% ácido trifluoroacético em água e eluente (B): 0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila (Tabela 20, pág 99).

Os resultados obtidos não apresentaram valores de inibição satisfatórios, e somente para as amostras que apresentaram uma inibição da enzima superior que 60%, foram calculados os IC<sub>50</sub> (Tabela 21).

**Tabela 20:** Tempo e porcentagem do eluentes A e B

Tempo	Eluente A	Eluente B
10 min	40%	60%
7 min	95 %	5%

**Tabela 21:** Porcentagem de inibição da enzima angiotensina I do extrato CVET e da casticina (CV-01)

Amostras	Inibição (%)
Extrato (10mg/mL)	37,17
Casticina (1mg/mL)	3,76

## **6.0 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *OCIMUM BASILICUM* VAR. *PURPURASCENS* BENTH (ALFAVACA ROXA)**

A alfavaca roxa (Figura 64, pág 101) foi identificada pelo professor L. W. Lima-Verde, como *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH. A exsicata (Figura 65, pág 101) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra pertencente no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará sob o número 058556.

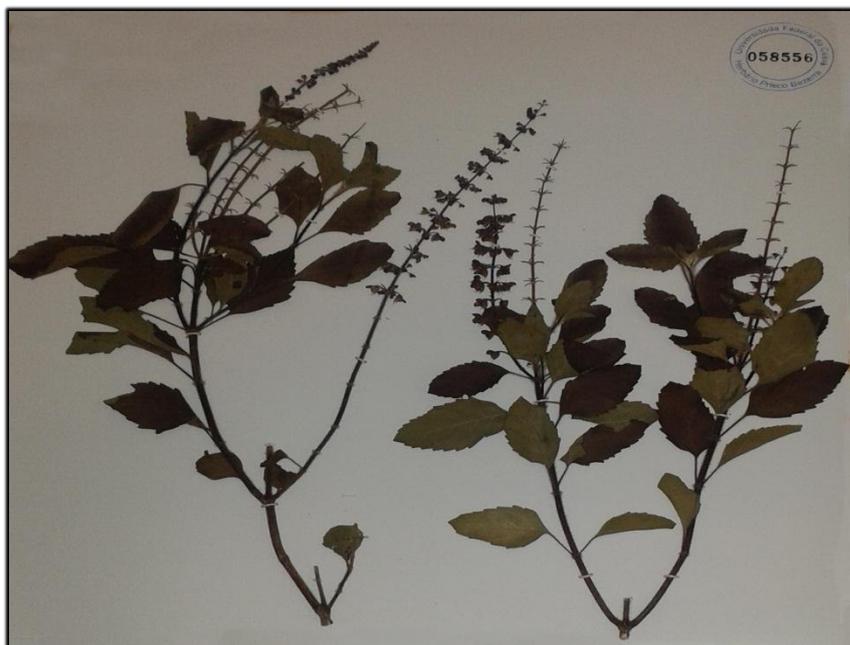
É uma planta semelhante à alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*), contudo dependendo das condições de sombreamento, a alfavaca roxa é capaz de reverter sua coloração de roxa para verde, enquanto a alfavaca cravo permanece sempre verde (GUERRA, 2013). O *Ocimum basilicum* L. trata-se de uma planta herbácea, podendo ser anual ou perene, que atinge até 1 m de altura e possui caule muito ramificado. O caráter aromático típico de cada tipo de *O. basilicum* é determinado pelo genótipo e depende dos principais compostos químicos presentes, dentre os principais estão timol, metil-chavicol, linalol, eugenol, 1,8-cineol e pineno (EHLERT *et al.*, 2006, LORENZI e MATOS, 2002, VIEIRA, 2009).

A morfologia das espécies de *Ocimum basilicum* é muito variável, a composição dos óleos essenciais depende vários fatores, desde a cor e o aroma das folhas e inflorescências assim como do lugar onde foram coletadas. De acordo com Ehlert *et al.*, (2006) a identificação botânica das espécies é bastante complicada por apresentar uma ampla ocorrência de variedades de *Ocimum*, além de diferenças na composição química de seus óleos essenciais. Labra *et al.*, (2004) ainda apontam que mediante a interferência do homem no cultivo dessas plantas como seleção e hibridação, no gênero, ocorre grande variação morfológica entre as suas diferentes espécies.

**Figura 64:** Fotos de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*. A-canteiro de cultivo; B- detalhes das folhas e inflorescências



**Figura 65:** Exsicata de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH



### **6.1 Estudo dos constituintes voláteis de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH (alfavaca roxa)**

Neste trabalho foram realizados três estudos relacionados à composição e a separação dos constituintes majoritários voláteis das folhas e inflorescências da alfavaca roxa, coletadas no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Agricultura Urbana – NEPAU, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará – UFC.

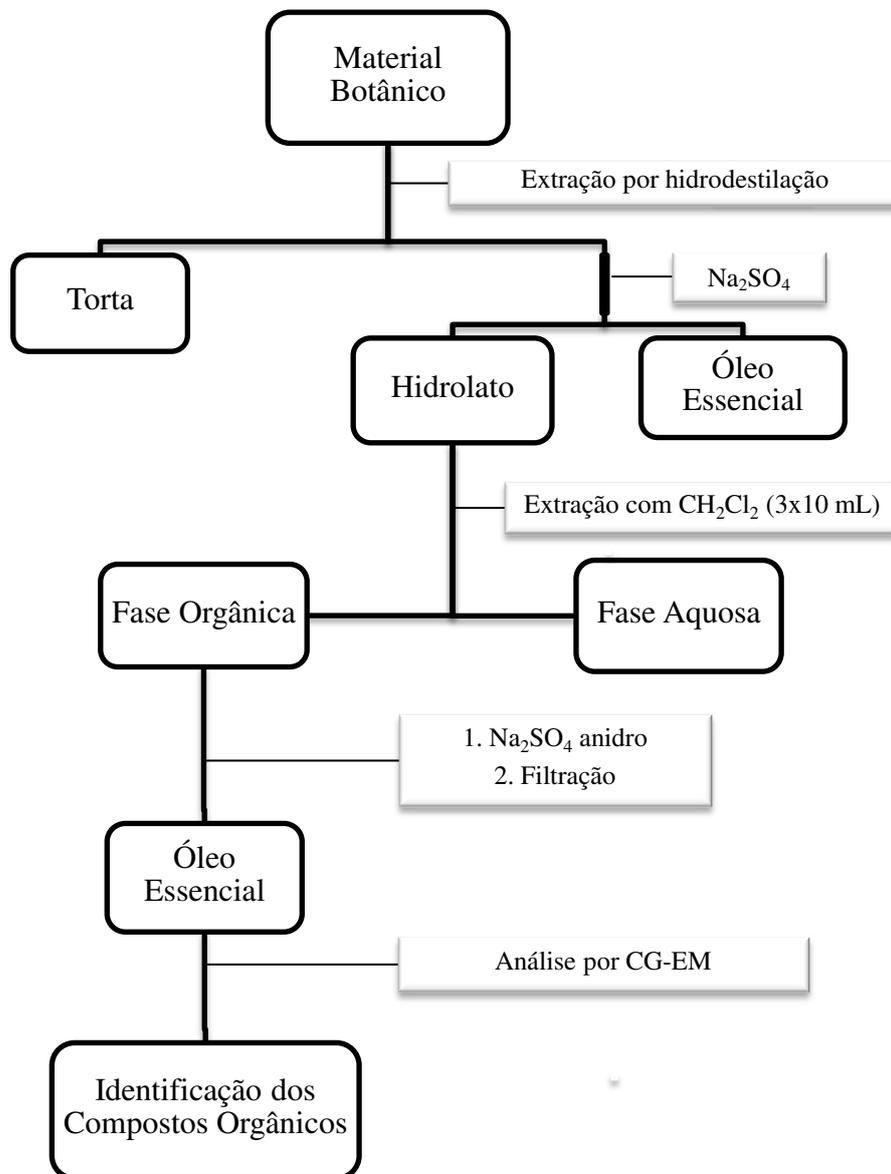
A espécie *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH será tratada daqui por diante como alfavaca roxa e a sigla OEAR (Óleo Essencial da Alfavaca Roxa) será utilizada para designar o óleo essencial obtido da mesma.

Os estudos se basearam nas seguintes avaliações:

- 1) Avaliação da composição volátil das partes aéreas de um espécimen, cultivado em canteiros expostos ao sol, no mês de julho de 2015.
- 2) Análise do óleo essencial obtido por (CG-EM).
- 3) Separar os compostos majoritários do óleo essencial (eugenol e  $\beta$ -cariofileno) do OEAR por DOSY.

Para a extração do óleo essencial, utilizou-se o método de hidrodestilação em aparelho doseador tipo Clevenger modificado por Gottlieb. A biomassa a ser analisada da espécie foi acondicionada em um balão de 5,0 L, seguido da adição de 2,8 L de água destilada. O sistema foi mantido sob aquecimento durante 2h30min. Em seguida, mediu-se o volume de óleo essencial no doseador, separando-o do hidrolato obtido e fez-se a extração do hidrolato com diclorometano (3 x 10mL), onde a fase orgânica foi concentrada e seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) como mostra o fluxograma 6 (pág 103). O rendimento da extração do óleo essencial foi obtido através da relação massa de planta/volume de óleo essencial extraído (p/v).

**Fluxograma 6:** Esquema de obtenção do óleo essencial do *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* (alfavaca roxa).



A amostra foi analisada por cromatografia gás-líquida acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e seus constituintes químicos identificados através de comparação de seus espectros de massa, com índice de Kovats corrigidos por regressão linear através do programa Microsoft Excel 2010 e comparação de seus espectros de massa com aqueles armazenados em banco de dados e confirmados através de comparação visual com espectros de massa disponíveis na literatura (ADAMS, 2001).

## 6.2 Avaliação da composição volátil da alfavaca roxa.

Para avaliação do óleo foram utilizadas as partes aéreas (406,1 g) de um espécime de alfavaca roxa, coletado no dia 17 de julho de 2015 às 12:00h. O óleo foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por um período de duas horas e trinta minutos conforme o procedimento descrito no item 6.1, pág 102. O óleo obtido, denominado OEAR (2,8 mL), apresentava odor agradável e coloração amarelo-pálida com o rendimento de 0,69% (p/v). A composição volátil do óleo encontra-se descrita na tabela 22, pág 113, incluindo seus índices de Kovats corrigidos.

De acordo com a análise de CG-EM de OEAR foram identificados 14 componentes químicos, representando 100% da composição química do óleo (Tabela 22, pág 105). Foi observado que o eugenol foi o componente majoritário que correspondeu com mais de 65% da composição total do óleo, seguido pelo  $\beta$ -cariofileno que correspondeu em mais de 23%. Portanto, a espécie *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH pode ser classificada no quimiotipo eugenol, por tê-lo como componente majoritário.

**Tabela 22:** Perfil dos constituintes químicos das partes aéreas de OEAR

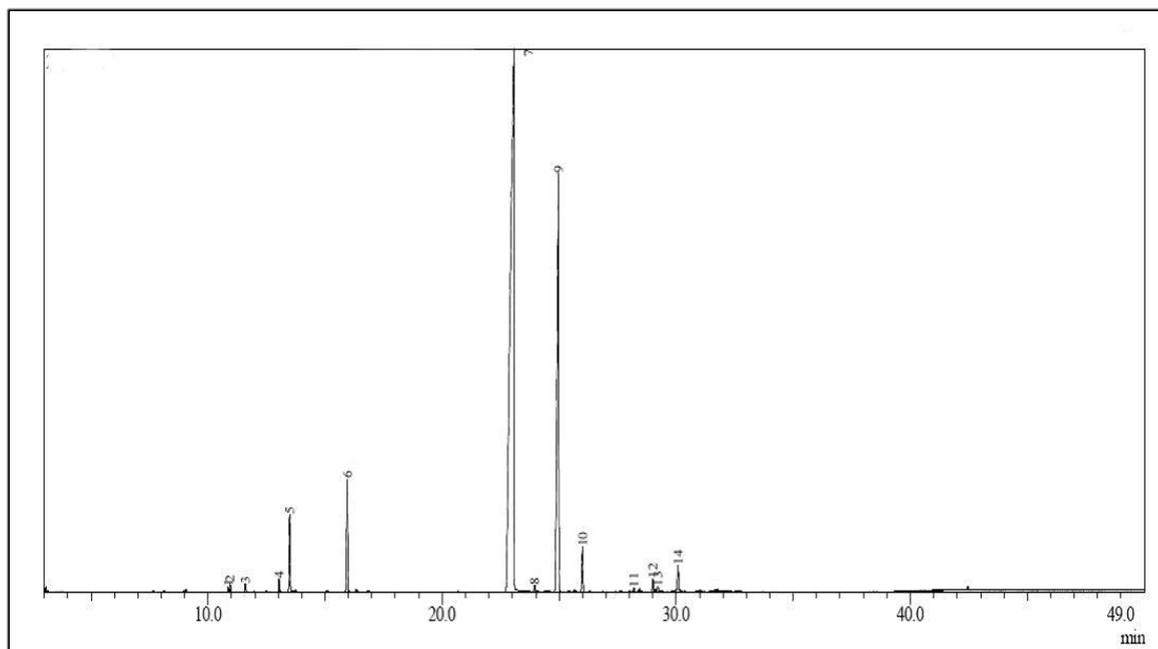
Constituintes	IK <sup>a</sup>	IK <sup>b</sup>	OEAR (%)
D-Limoneno (1)	1029	1022	0,12
Eucaliptol (2)	1031	1024	0,27
Cis- $\beta$ -ocimeno (3)	1037	1043	0,24
Cis-óxido de linalol (4)	1087	1084	0,39
$\beta$ -Linalol (5)	1097	1097	2,37
Borneol (6)	1169	1168	4,14
<b>Eugenol (7)</b>	<b>1359</b>	<b>1373</b>	<b>65,24</b>
$\beta$ -Elemeno (8)	1391	1398	0,20
<b><math>\beta</math>-Cariofileno (9)</b>	<b>1419</b>	<b>1427</b>	<b>23,42</b>
$\alpha$ -Humuleno (10)	1455	1457	1,63
$\Delta$ -Cadineno (11)	1523	1520	0,14
4-Elemol (12)	1550	1543	0,47
Elemicina (13)	1557	1549	0,31
Óxido de Cariofileno (14)	1583	1574	1,07
Total %	-	-	100,0

IK<sup>a</sup> da literatura (ADAMS, 2001)

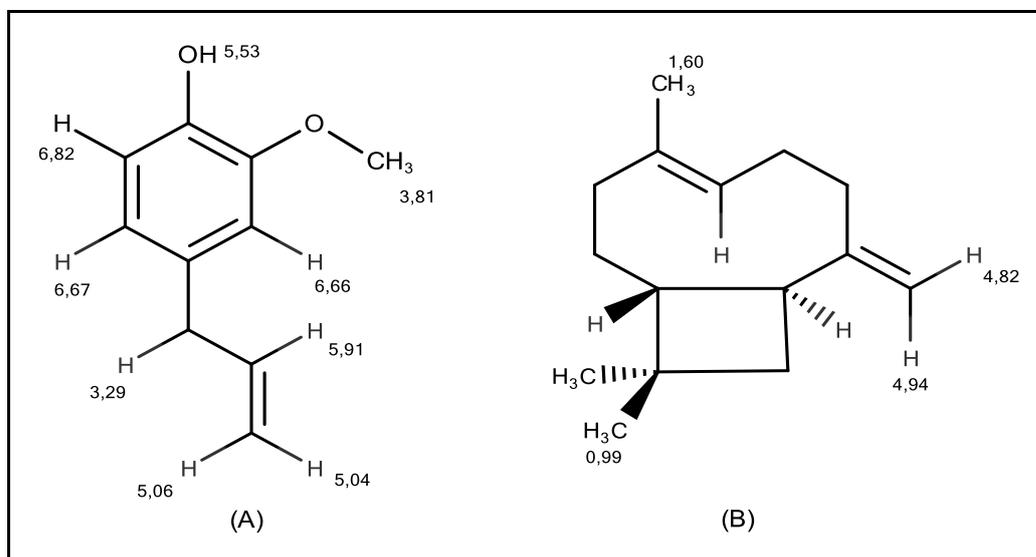
IK<sup>b</sup> corrigido por regressão linear

As figuras 66 e 68 (páginas 106 e 107), representam o cromatograma por CG-EM e o espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de OEAR respectivamente. No espectro de RMN <sup>1</sup>H os constituintes químicos eugenol (7) e  $\beta$ -cariofileno (9) (Figura 67, pág 106) foram identificados e os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram comparados aos dados registrados na literatura para esses compostos, obtidos em RMN <sup>1</sup>H 400 MHz, CDCl<sub>3</sub> (SAITO *et al.*, 2011) para o eugenol (7) e em RMN <sup>1</sup>H 500 MHz, CDCl<sub>3</sub> (GRAMOSA, 2001) para o  $\beta$ -cariofileno (9).

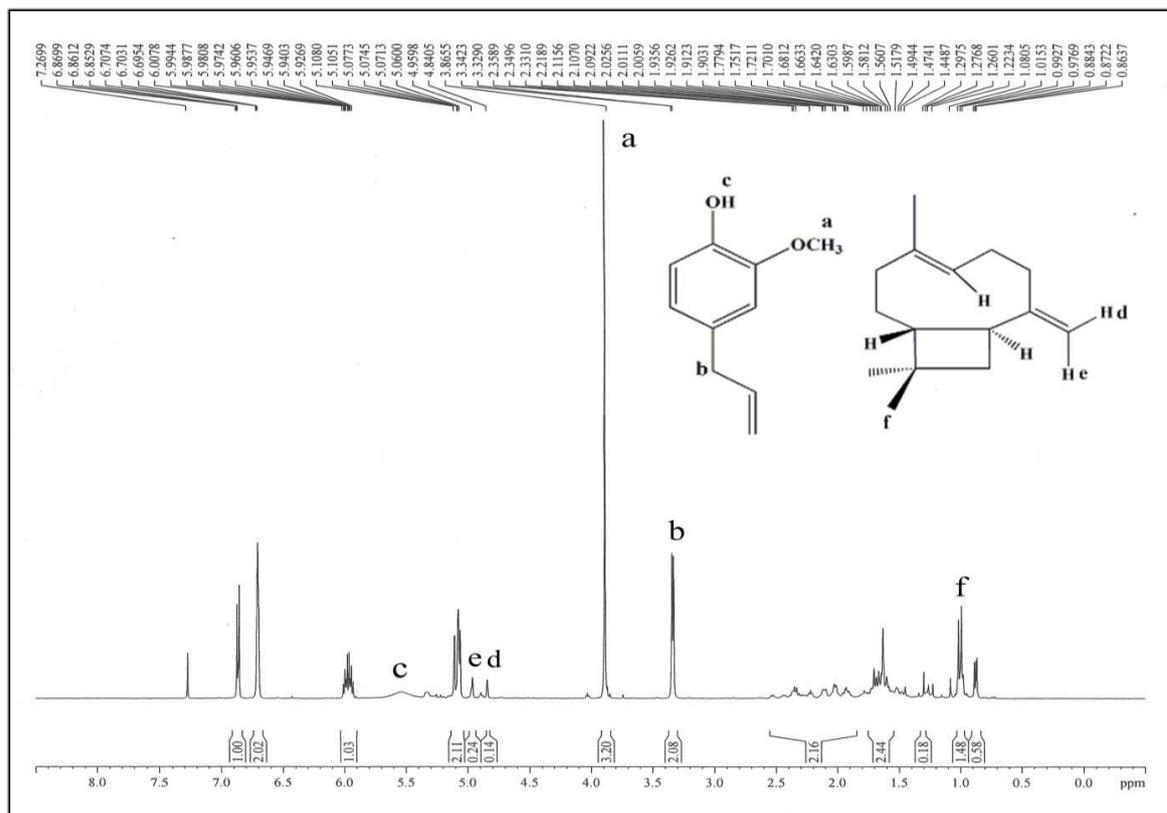
**Figura 66:** Cromatograma de CG-EM de OEAR



**Figura 67:** Estruturas com deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  do eugenol (A) e  $\beta$ -cariofileno (B)



**Figura 68:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de OEAR



### 6.3 Obtenção do eugenol a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC).

A espécie *Syzygium aromaticum* é conhecida popularmente como cravo-da-índia e pertence à família Mirtaceae. Seu óleo essencial possui alto valor econômico no mercado por apresentar um elevado teor de eugenol que é seu composto majoritário, e que ainda exibe comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico, anestésico e antioxidante (OLIVEIRA, 2009; GOBBO & LOPES, 2007).

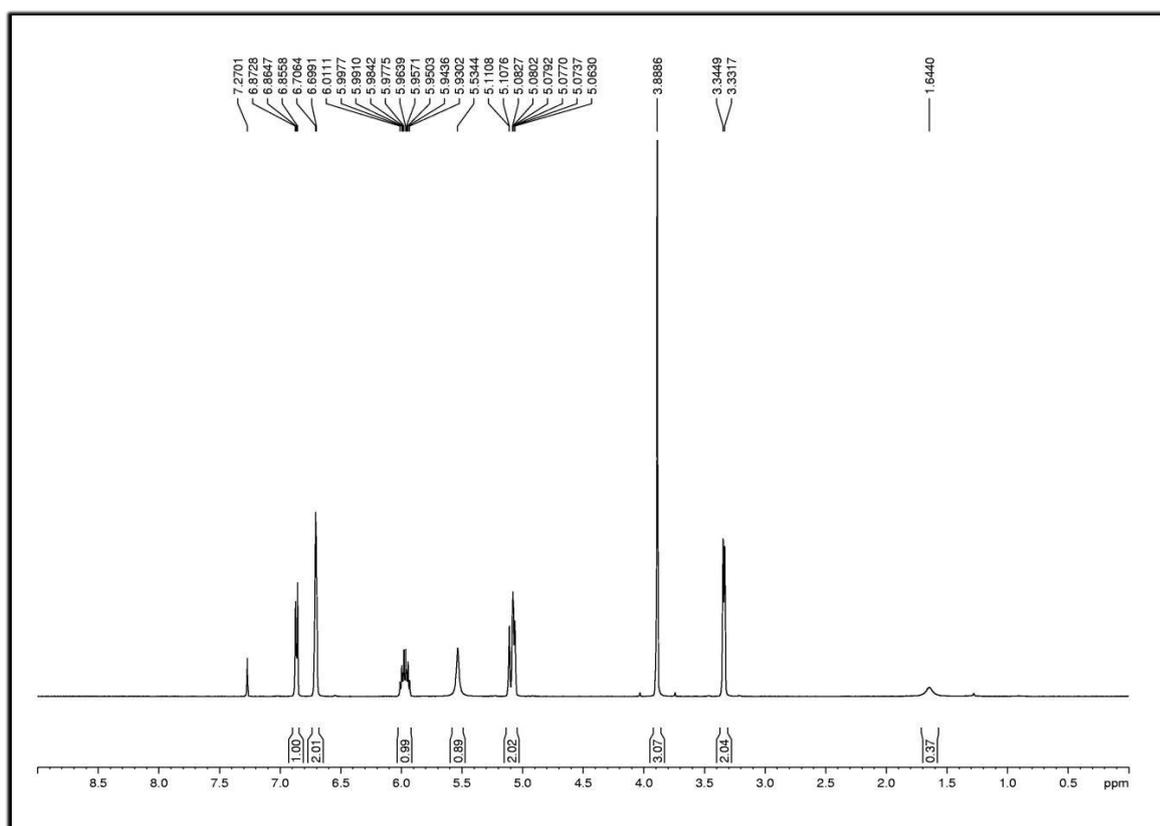
A obtenção do eugenol a partir do óleo de cravo-da-índia se deu por conta do alto rendimento de óleo essencial extraído por hidrodestilação relacionado ao óleo essencial da alfavaca roxa, cujo rendimento mostrou ser relativamente baixo. Para a extração do óleo foram utilizados 490,0 g trituradas de cravo-da-índia adquiridas no mercado São Sebastião em Fortaleza-CE, e submetidas a um processo de hidrodestilação semelhante ao mostrado no item 6.1, pág 102. Foram obtidos 14,0 mL de óleo denominado OEC com rendimento de 2.85% (p/v).

Para a obtenção de eugenol, foram utilizados 5,0 mL (5,3 g) do óleo do cravo-da-índia (OEC) dissolvidos em 40 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e colocado em um funil de separação. A solução obtida foi extraída com uma solução de NaOH 1M (2 x 50mL) resultando em duas fases: fase orgânica e fase aquosa básica. A fase orgânica foi tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo para a extração do solvente.

À fase aquosa foi adicionada uma solução de HCl 3M (1 x 40 mL), extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL), tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrada para a retirada do solvente em evaporador rotativo. Foram obtidos 2.8 mL (3,0 g) de eugenol, com 56,3% de rendimento. A reação foi repetida uma segunda vez para obtenção de mais eugenol.

Após a reação, o material foi analisado por RMN. A Figura 69 representa o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do eugenol obtido.

**Figura 69:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do eugenol



#### 6.4 Obtenção do $\beta$ -cariofileno a partir do óleo essencial do cravo-da-índia.

A fração orgânica, obtida da primeira partição na reação de extração do eugenol a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC) ítem 6.3, resultou em 1,0 g de óleo. A fração foi adsorvida em 1,5g de sílica e submetida a uma coluna cromatográfica utilizando 50,0 g de sílica gel. A fase móvel consistiu de um gradiente de solventes hexano, acetato de etila e por fim metanol (Tabela 23).

**Tabela 23:** Frações obtidas da coluna cromatográfica da fração orgânica de OEC

Eluente	Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
Hexano	OEC- R 1	45,5	4,50
<b>Hexano</b>	<b>OEC- R 2</b>	<b>181,8</b>	<b>18,00</b>
Hexano	OEC- R 3	28,7	2,84
Hexano/AcOEt 5%	OEC- R 4	0,4	0,04
Hexano/AcOEt 10%	OEC- R 5	0,6	0,06
Hexano/AcOEt 15%	OEC- R 6	133,0	13,17
Hexano/AcOEt 30%	OEC- R 7	100,8	9,98
MeOH	OEC- R 8	378,0	37,43
Total	-	868,8	86,02

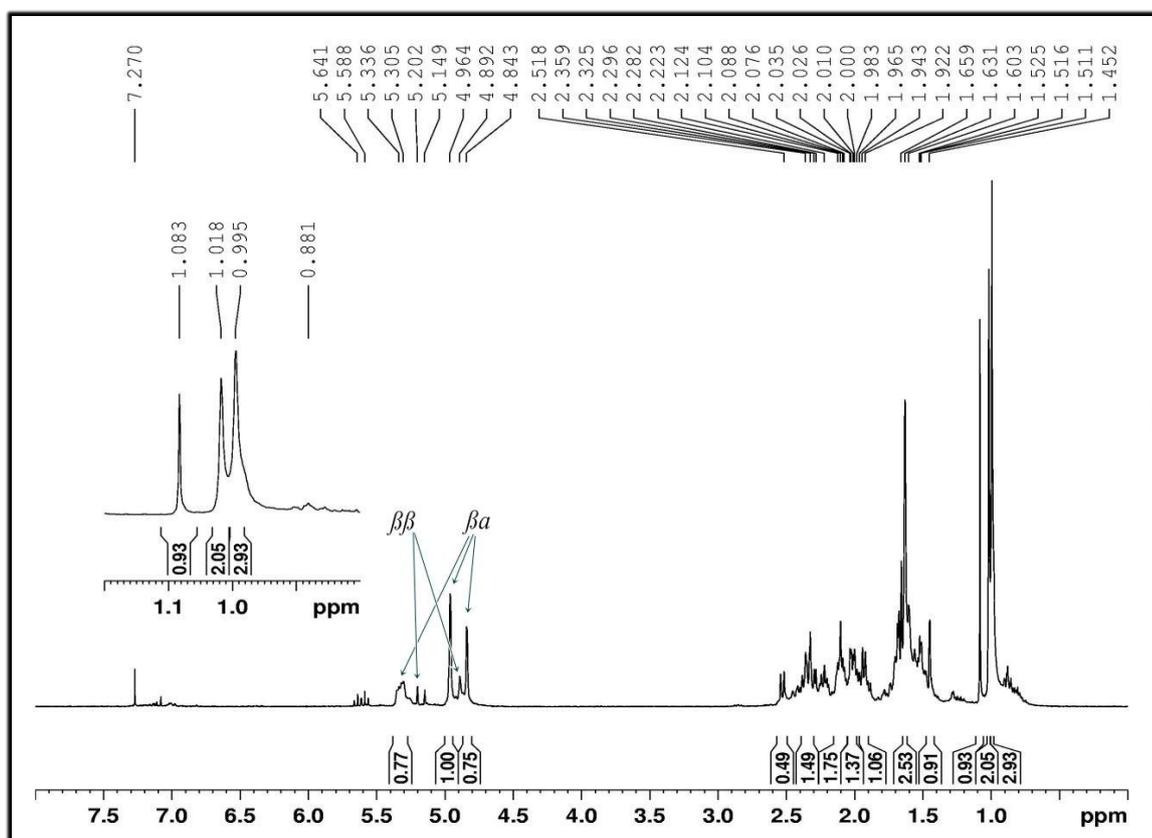
Os valores de deslocamento químico da fração OEC-R 2, obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 70, pág 110) e RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 71, pág 111) permitiram deduzir que a fração OEC-R 2 se tratava da mistura dos confômeros  $\beta\alpha$  e  $\beta\beta$  do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno. Segundo Barrero, *et al.*, (1995), na temperatura de 25°C, esse composto existe na mistura dos isômeros conformacionais  $\beta\alpha$  e  $\beta\beta$  em uma razão de 82:18. Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  foram comparados com dados da literatura (Tabela 24, pág 110)

**Tabela 24:** Valores de deslocamento de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) dos confôrmeros  $\beta\alpha$  e  $\beta\beta$  do  $\beta$ -cariofileno comparados com a literatura ( $\text{CDCl}_3$ ).

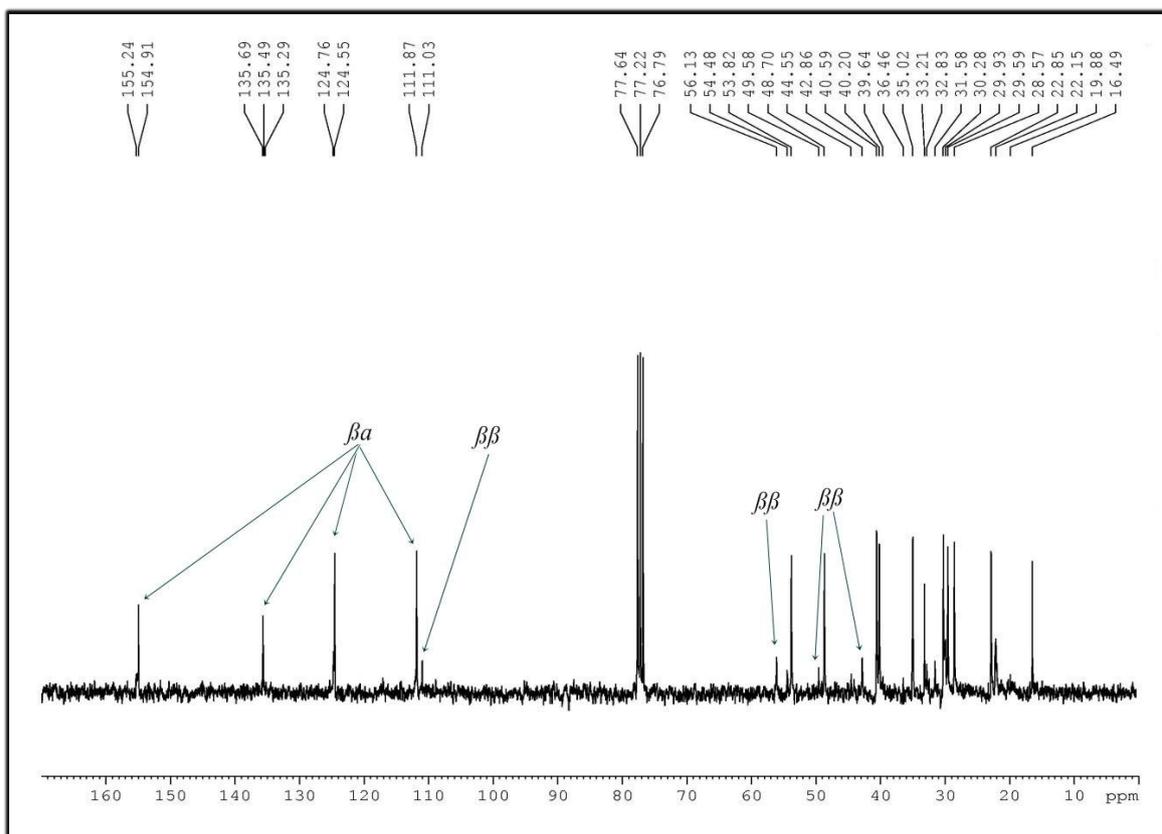
C	$\delta\text{C}-\beta\alpha$	Literatura - $\beta\alpha^*$	$\delta\text{C}-\beta\beta$	Literatura - $\beta\beta^*$
1	53,82	53,7	56,13	56
2	28,57	28,4	29,93	29,8
3	40,2	40,1	35,02	34,9
4	135,69	135,6	135,29	135,1
5	124,55	124,4	124,76	124,6
6	29,59	29,5	31,58	31,5
7	35,02	34,9	39,64	39,9
8	154,91	154,8	155,24	155,2
9	48,7	48,6	49,58	49,5
10	40,59	40,4	42,86	42,7
11	33,21	33,1	32,83	33,1
12	22,85	22,7	22,15	22
13	30,28	30,2	29,93	29,9
14	16,49	16,4	16,49	16,4
15	111,87	111,7	111,03	110,9

\* (BARRERO, *et al.*, 1995)

**Figura 70:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos confôrmeros  $\beta\alpha$  e  $\beta\beta$  do  $\beta$ -cariofileno



**Figura 71:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos confôrmers  $\beta\alpha$  e  $\beta\beta$  do  $\beta$ -cariofileno



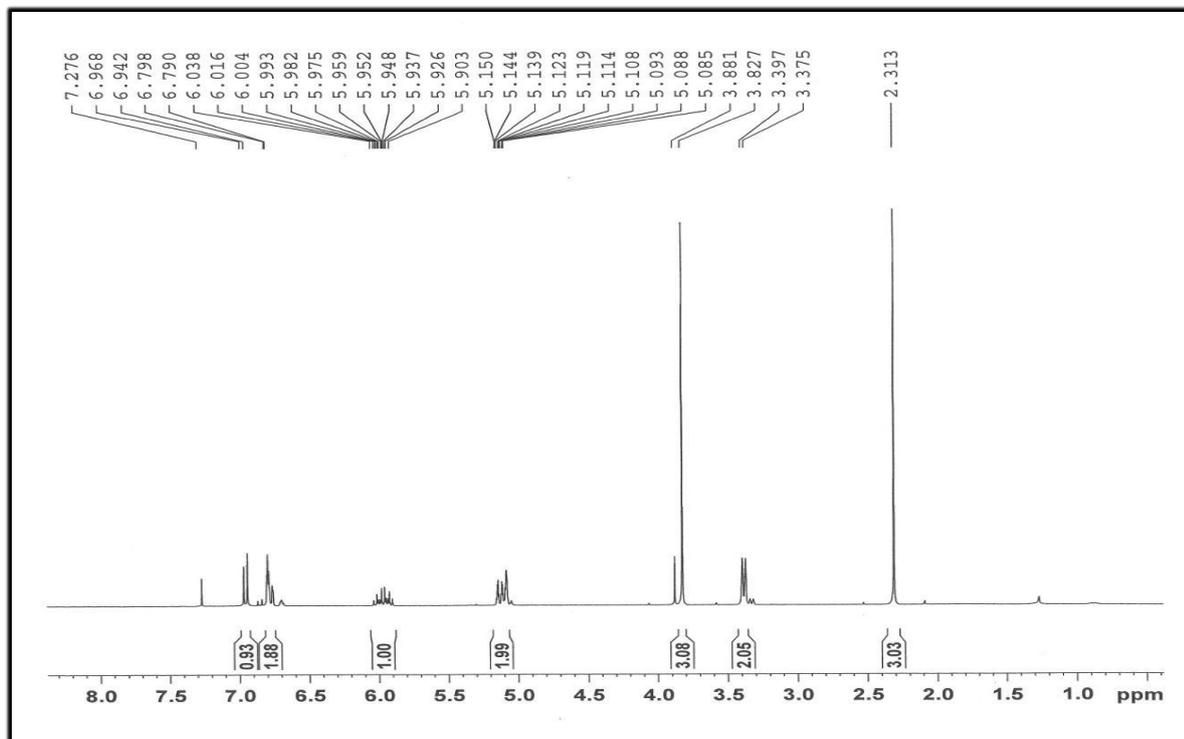
## 6.5 Reação de acetilação de eugenol

Para obtenção do acetato de eugenila (Figura 74, pág 113), foram utilizados 500,0 mg de eugenol adicionados de 50 mL de anidrido acético e 2,5 mL de piridina colocados sob agitação em um erlenmeyer de 100 mL por 14 horas. Após este período, a solução foi acidificada com 4,0 mL de HCl 0,1M e particionado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL) em um funil de separação. O material resultante foi posto em um balão de 100 mL e colocado num evaporador rotativo para a extração do solvente, obtendo no final 378,0 mg do material acetilado denominado OEC-1 com rendimento de 75,6%.

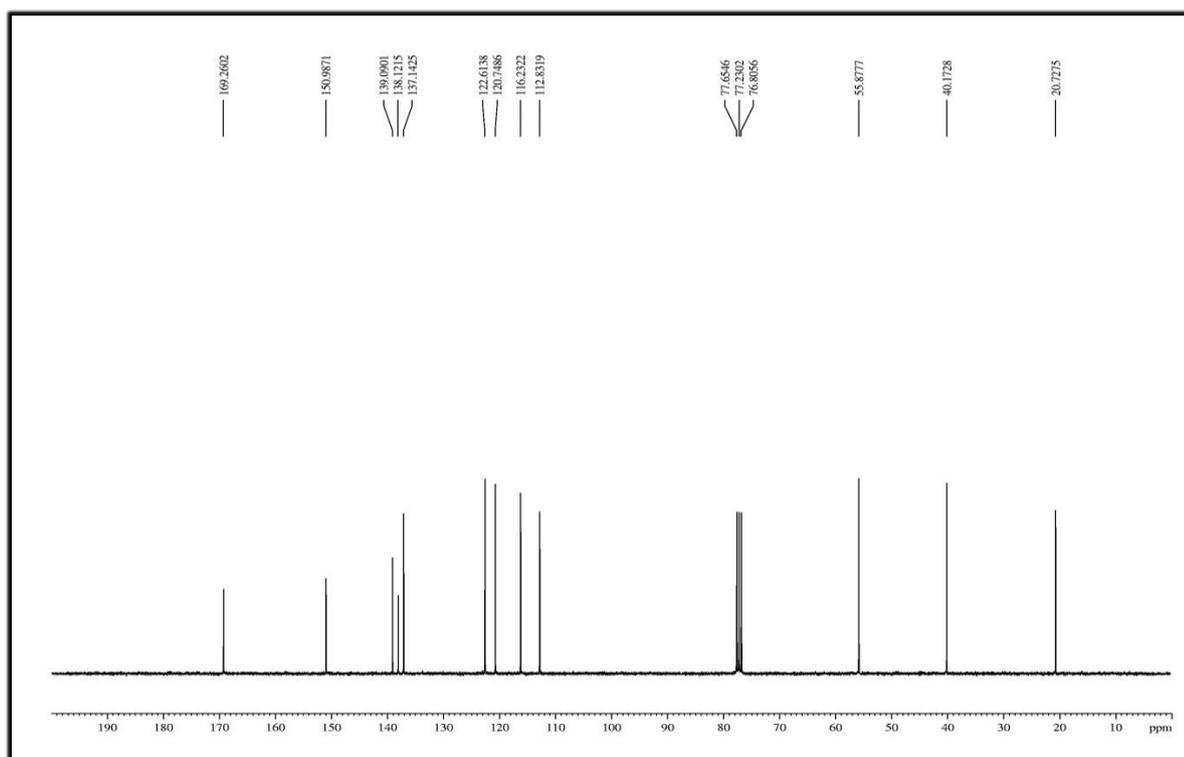
O composto resultante da reação foi analisado por RMN. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1 (Figura 72, pág 112), revelou a presença de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,31 característico de metila ligada a uma carbonila. Os deslocamentos químico de carbono - 13 revelados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1 (Figura 73, pág 112) foram comparados com dados da literatura (Tabela 25, pág 113).

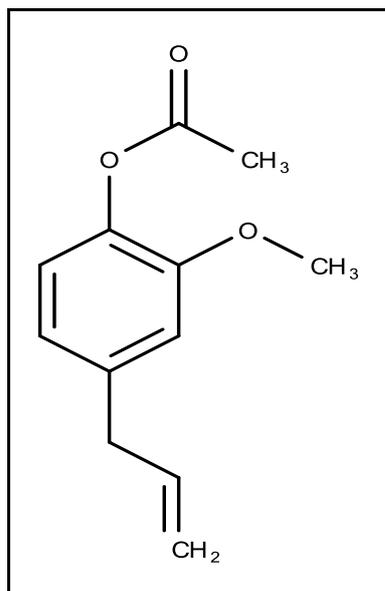
O composto acetato de eugenila foi obtido com o objetivo de utilizá-lo nas análises de MAD.

**Figura 72:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1



**Figura 73:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1



**Figura 74:** Acetato de eugenila (OEC-1)**Tabela 25:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de OEC-1 comparados aos dados da literatura

C	$\delta^{13}\text{C}$ (OEC-1)	Acetato de eugenila* ( $\text{CDCl}_3$ )
1	138,12	138,23
2	150,98	151,08
3	112,83	112,95
4	139,09	139,21
5	120,74	120,88
6	122,61	122,72
7	40,17	40,29
8	137,14	137,24
9	116,23	116,34
11	55,87	56,01
13	169,26	169,39
14	20,72	20,85

\*(AFFONSO, *et al.*, 2014)

## 6.6 Reação de isomerização do eugenol

Os estereoisômeros *Cis* e *Trans* - isoeugenol foram obtidos para análises de MAD. Para obtenção do isômero isoeugenol, utilizou-se a metodologia descrita por Carrasco e colaboradores, (2008). Foram utilizados 3,5 mL (3,8 g) de eugenol adicionado de 10 mL (10,6 g) de etilenoglicol e 6,0 g de KOH. A mistura foi colocada em um balão de 100 mL acoplado a um condensador e a uma manta aquecedora. O sistema permaneceu sob refluxo por

aproximadamente 5 horas a uma temperatura aproximada de 140° C. Após esse tempo, a solução foi deixada resfriar até a temperatura ambiente, acidificada com 25 mL de HCl 6,0 M e extraída em um funil de decantação com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 mL) seguida por secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Foram obtidos 3,0 g de um óleo amarelado denominado OEC-3 com rendimento de 80,42%.

O material obtido (OEC-3), após análise por CCD foi adsorvido em 3,0 g de sílica e submetido a uma coluna gravitacional utilizando sílica comum, a fase móvel constituída dos solventes hexano e diclorometano, num gradiente de 10-70%, acetato de etila e por fim metanol, sendo utilizado 100 mL de cada eluente. Foram obtidas 7 frações, coletadas em balões de 250 mL e 52 frações coletadas em recipientes de 10 mL sendo posteriormente reunidas de acordo com a análise por CCD (Tabela 26).

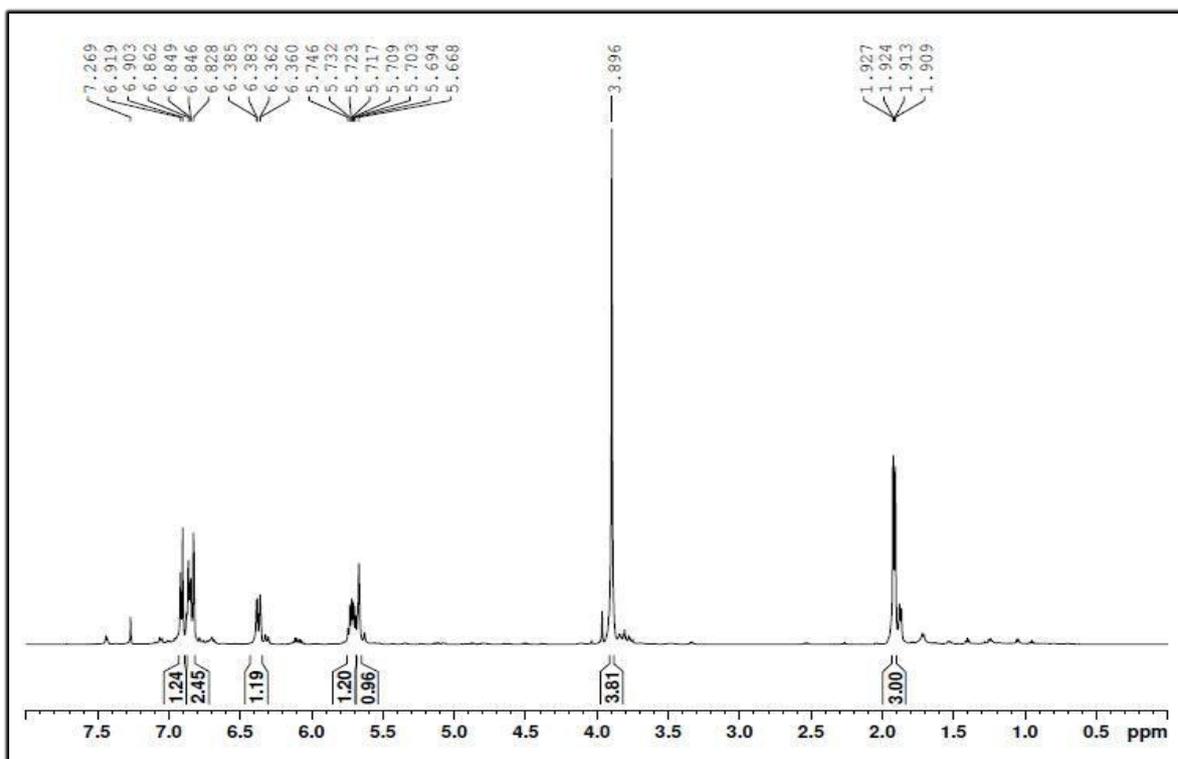
**Tabela 26:** Frações obtidas da coluna cromatográfica de OEC-3

Eluente	Fração	Amostras coletadas	Amostras reunidas	Massa (mg)	Rendimento
Hexano	ISO-1	Balão	-	2,5	0,07
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10%	ISO-2	1 – 11	1 – 22	17,0	0,48
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20%	ISO-3	12 – 22	13 – 26	11,0	0,31
<b>Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 30%</b>	<b>ISO-4</b>	<b>23 – 31</b>	<b>27 – 30</b>	<b>114,8</b>	<b>3,27</b>
<b>Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40%</b>	<b>ISO-5</b>	<b>32 – 43</b>	<b>31 – 52</b>	<b>1508,0</b>	<b>42,94</b>
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50%	ISO-6	44 – 52	-	78,0	2,22
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70%	ISO-7	Balão	-	78,0	2,22
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	ISO-8	Balão	-	12,8	0,36
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 50 %	ISO-9	Balão	-	54,7	1,56
AcOEt	ISO-10	Balão	-	432,7	12,32
AcOEt/MeOH 50%	ISO-11	Balão	-	157,8	4,49
MeOH	ISO-12	Balão	-	185,9	5,29
Total	-	-	-	2653,2	75,55

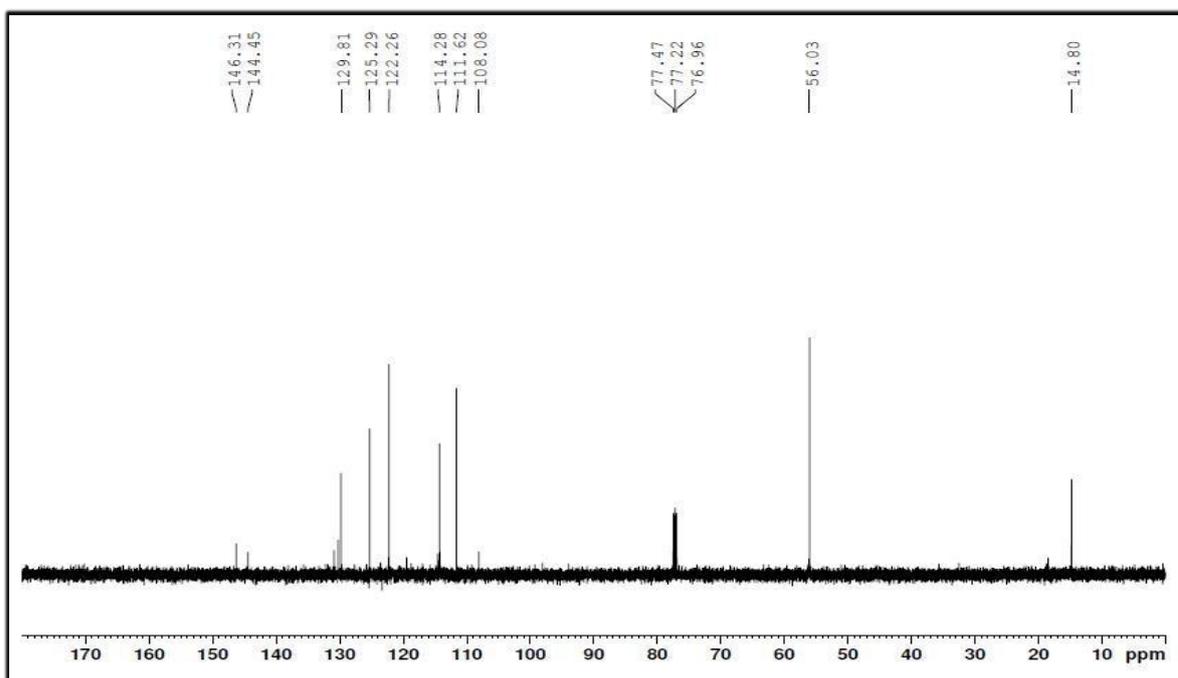
As frações ISO-4 e ISO-5 se mostraram homogêneas após análise por CCD e foram analisadas por RMN. Os valores de deslocamento químico encontrados nos espectros de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 75, pág 115) e RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 76, pág 115) da fração ISO-4, foram comparados com os dados da literatura (Tabela 27, pág 116), permitindo identificar ISO-4 como o composto *Cis*-isoeugenol (Figura 79, pág 118). A fração

ISO-5, após comparação dos valores de deslocamento químico revelados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 77, pág 116) e RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 78, pág 117) com os dados da literatura (Tabela 28, pág 117), permitiram identificar a fração ISO-5 como uma mistura dos estereoisômeros *Cis* e *Trans* – isoeugenol (Figura 79, pág 118).

**Figura 75:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-4 (*Cis*-isoeugenol)

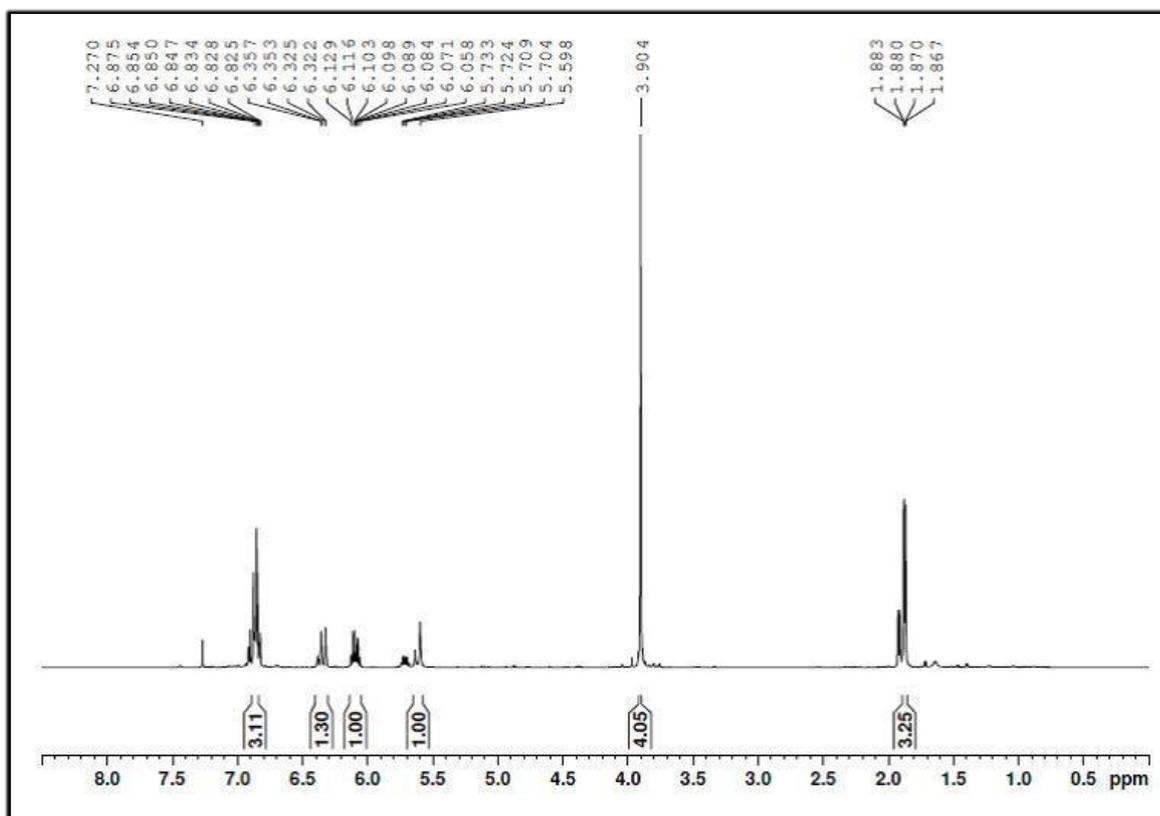


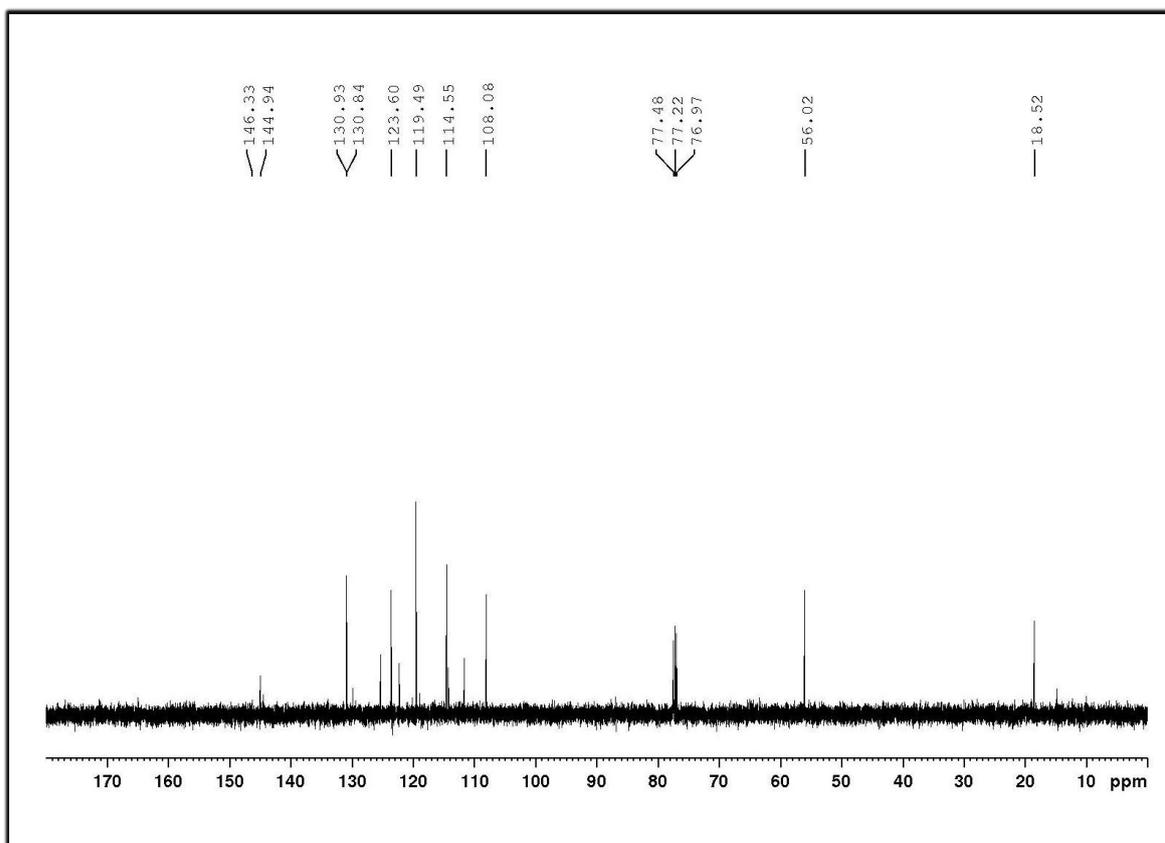
**Figura 76:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-4 (*Cis*-isoeugenol)



**Tabela 27:** Deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de ISO-4 comparado com dados da literatura

C	ISO-4 ( $\text{CDCl}_3$ )		<i>Cis</i> -isoeugenol ( $\text{CDCl}_3$ )*	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
1	144,46	-	144,29	-
2	146,31	-	146,10	-
3	111,62	6,82 (d, $J = 1,3\text{Hz}$ , 1H)	111,43	6,80 (d, $J = 1,8\text{Hz}$ , 1H)
4	129,81	-	129,64	-
5	122,26	6,84 - 6,86 (m, 1H)	122,09	6,83 - 6,86 (m, 1H)
6	114,28	6,90 (d, $J = 8,1\text{Hz}$ , 1H)	114,10	6,89 (d, $J = 8,4\text{Hz}$ , 1H)
1'	130,24	6,35 (dq, $J=15,7\text{Hz}$ , $1,3\text{Hz}$ , 1H)	130,08	6,35 (dq, $J=15,6\text{Hz}$ , $1,8\text{Hz}$ , 1H)
2'	125,29	5,69 (dq, $J=11,5\text{Hz}$ , $7,1\text{Hz}$ , 1H)	125,14	5,69 (dq, $J=12,0\text{Hz}$ , $7,2\text{Hz}$ , 1H)
3'	14,80	1,90 (dd, $J=7,2\text{Hz}$ , $1,6\text{Hz}$ , 3H)	14,64	1,89 (dd, $J=7,2\text{Hz}$ , $1,8\text{Hz}$ , 3H)
$\text{OCH}_3$	56,04	3,89 (s, 3H)	55,87	3,86 (s, 3H)
- OH	-	5,66 (s, 1H)	- OH	5,63 (s, 1H)

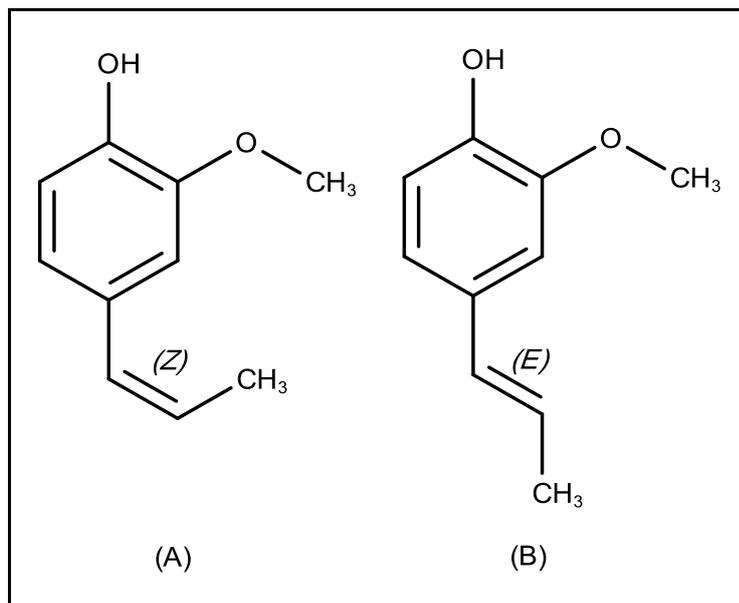
\*(LUU *et al.*, 2009)**Figura 77:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-5 (*Trans*-isoeugenol)

**Figura 78:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de ISO-5 (*Trans*-isoeugenol)**Tabela 28:** Deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de ISO-5 comparado com dados da literatura

C	ISO-5 ( $\text{CDCl}_3$ )		<i>Trans</i> -isoeugenol ( $\text{CDCl}_3$ )*	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
1	144,94	-	144,76	-
2	146,32	-	146,57	-
3	108,08	6,82 - 6,87 (m, 3H)	107,90	6,80 - 6,86 (m, 3H)
4	130,84	-	130,66	-
5	119,49	6,82 - 6,87 (m, 3H)	119,31	6,80 - 6,86 (m, 3H)
6	114,55	6,82 - 6,87 (m, 3H)	114,37	6,80 - 6,86 (m, 3H)
1'	130,92	6,32 (dq, $J=15,7\text{Hz}$ , 1,6Hz, 1H)	130,75	6,31 (dq, $J=15,6\text{Hz}$ , 1,8Hz, 1H)
2'	123,60	6,05 (dq, $J=15,7\text{Hz}$ , 6,6Hz, 1H)	123,42	6,07 (dq, $J=15,6\text{Hz}$ , 6,6Hz, 1H)
3'	18,52	1,86 (dd, $J=6,6\text{Hz}$ , 1,6Hz, 3H)	18,34	1,84 (dd, $J=6,6\text{Hz}$ , 1,8Hz, 3H)
$\text{OCH}_3$	56,02	3,89 (s, 3H)	55,83	3,87 (s, 3H)
- OH	-	5,59 (s, 1H)	- OH	5,59 (s, 1H)

\*(LUU *et al.*, 2009)

**Figura 79:** Estruturas do *cis*-isoeugenol (A) e *trans*-isoeugenol (B)



### 6.7 Ensaio de atividade larvicida dos óleos essenciais OEAR, OEC, eugenol e acetato de eugenila.

Os bioensaios para a determinação da atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, foram realizados com a mesma metodologia utilizada para os extratos de *Croton velutinus* (Item 5.3, pág 97).

Os óleos essenciais da alfavaca roxa (OEAR), óleo essencial do cravo-da-índia (OEC), acetato de eugenila e eugenol tiveram seu potencial larvicida testados frente às larvas de *Aedes aegypti*. As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2 % (v/v), e analisados em concentrações de 62,5; 100, 200, 250, 500 mg.L<sup>-1</sup>. A essas soluções, foram adicionadas um total de 20 larvas para cada 20mL de solução, em recipiente de vidro de 200mL. Após um período de 10 minutos, 1 hora e após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, o número de larvas mortas foi registrado sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur. A temperatura ambiente variou entre 27° C e 30° C.

O ensaio foi realizado em triplicata e calculado o valor da DL<sub>50</sub>. Paralelamente, foram realizados testes em branco, utilizando-se DMSO 2% (v/v).

Os resultados foram plotados em gráfico de porcentagem de letalidade versus concentração (mg/L) e os valores da DL<sub>50</sub> foram estimados de acordo com a equação da curva

baseada em modelo sigmoidal. Utilizando-se o programa *Jardel Scientific, Table Curve<sup>tm</sup> Windows v1.0*

A alfavaca roxa e o cravo-da-índia nas concentrações de 500 ppm apresentaram índice de letalidade de 100% das larvas nos primeiros 10 minutos o que indica elevado potencial larvicida. Após 1 hora de exposição, as larvas foram recontadas e a alfavaca roxa assim como o cravo-da-índia apresentaram 100% de letalidade nas concentrações de 250 ppm e o acetato de eugenila e o eugenol apresentaram 100% de letalidade nas concentrações em 500 ppm. A dose de letalidade de 50% das larvas mortas foram calculadas após 24 horas de exposição (Tabela 29).

**Tabela 29:** Concentrações letais (mg/L) para 50% das larvas de *Aedes aegypti* no 3° estágio

<b>Amostra</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/L)*</b>
Alfavaca roxa	IC <sub>50</sub> = 93,70 mg/L
Cravo-da-índia	IC <sub>50</sub> = 99,92 mg/L
Eugenol	IC <sub>50</sub> = 71,61 mg/L
Acetato de eugenila	IC <sub>50</sub> = 96,36 mg/L

\*DL<sub>50</sub>= Concentração da dose de letalidade de 50% das larvas após 24 horas de exposição.

## 7.0 DIFUSÃO MOLECULAR

O estudo da difusão molecular, fenômeno ocasionado pelos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas em consequência da energia térmica do sistema, fornece uma gama de informações sobre as propriedades físicas das moléculas como tamanho molecular, forma, agregação, encapsulamento e complexação (SOUZA, *et al.*, 2009; CLARIDGE, 2009).

A probabilidade condicional  $P(x_0, x, t)$  de se encontrar uma molécula em uma posição inicial ( $x_0$ ) e após um tempo ( $t$ ) ter se deslocado para uma nova posição ( $x$ ) é dada pela equação [1]:

$$P(x_0, x, t) = (4\pi Dt)^{-3/2} \exp [-(x - x_0)^2/4Dt] \quad [1]$$

Onde  $D$  é o coeficiente de difusão da molécula.

As medidas de difusão translacional são feitas de modo que se consiga a informação do tamanho molecular, ou seja, o coeficiente de difusão está relacionado com o tamanho molecular (VIERA, 2014), como mostra a equação [2]:

$$D = k_B T / f \quad [2]$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura da solução e  $f$  é o fator de fricção da partícula. Considerando a partícula como esférica, em um meio de viscosidade  $\eta$ , o fator de fricção  $f$  pode ser expresso pela equação de Stokes [3]:

$$f = 6\pi\eta r_s \quad [3]$$

Onde  $r_s$  consiste no raio hidrodinâmico da partícula. As equações [2] e [3] após combinadas, obtém-se a relação conhecida de Einstein, que fornece informações para os teoremas de dissipação relacionando o coeficiente de difusão  $D$  com a temperatura absoluta  $T$  e viscosidade  $\eta$  do meio (SALINAS, 2005), obtendo-se a equação de Stokes-Einstein [4], onde o raio hidrodinâmico  $r_s$  (tamanho da partícula) é inversamente proporcional a seu coeficiente de difusão  $D$ .

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad [4]$$

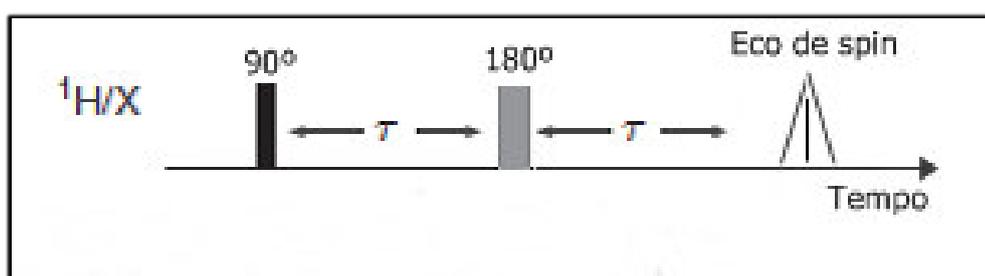
As informações obtidas pela difusão molecular fornecem meios de interpretar a organização molecular assim como a taxa de mobilidade das partículas que podem ser usadas como base para separação de misturas de compostos em solução (CLARIDGE, 2009).

## 7.1 Difusão por RMN

### 7.1.1 O método de Hahn

A sequência de pulsos introduzida por Erwin L. Hahn, em 1950 (Figura 80), consistia na aplicação de um pulso RF de 90° ao longo do eixo x, direcionando a magnetização para o eixo y, após a desfocalização da magnetização por um tempo  $\tau$ , é aplicado um novo pulso RF de 180° que gira a magnetização em torno do eixo x refocalizando a magnetização após um tempo  $\tau$ , formando assim um eco. Embora a proposta original de Hahn considere o segundo pulso RF como de 90°, a utilização como sendo um pulso RF de 180° é mais didática e foi proposta por Carr e Purcell, contudo o experimento ficou conhecido como “eco de spin” de Hahn (HAHN, 1950; CARR & PURCELL, 1954; SOUZA, *et al.*, 2009).

**Figura 80:** Sequência de ecos de spin de Hahn

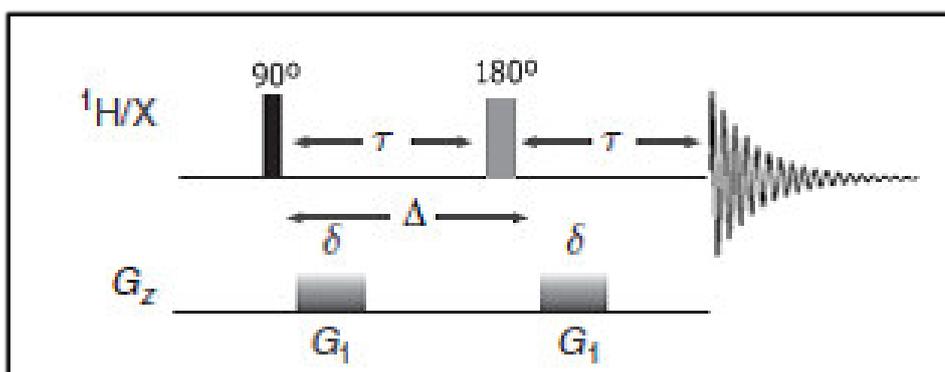


As informações obtidas pelo fenômeno de eco de spin permitiram o estudo da difusão molecular, tendo em vista que todas as medidas de difusão obtidas por RMN são baseadas no coeficiente de difusão calculado pela atenuação do sinal, sendo aplicado um gradiente de campo magnético de duração conhecida (JOHNSON Jr, 1999).

### 7.1.2 Sequencia de eco de spin com gradiente de campo pulsado (PFGSE)

Os valores de coeficiente de difusão podem ser medidos aplicando a técnica de ecos de spin com gradientes de campo magnético pulsados (PFGSE), ideia introduzida por Stejskal e Tanner (STEJSKAL & TANNER, 1965). Na ausência de pulsos de gradiente, os spins apresentam uma coerência de fase e a refocalização é obtida pelo segundo pulso RF de  $180^\circ$ , contudo quando se aplicam gradientes de campo pulsado, o primeiro pulso de gradiente  $\delta$  torna a fase dos vetores magnetizados espacialmente dependentes, ou seja, ficam dependentes de sua posição, que podem ser refocalizadas pelo segundo pulso de gradiente  $\delta$  de igual intensidade e duração, os quais são aplicados no mesmo sentido e se cancelam pela aplicação do pulso RF de  $180^\circ$  (Figura 81). Nesse sentido, a completa refocalização do sinal só será alcançada quando o campo local experimentado pelos spins for idêntico durante os dois pulsos de gradiente. Logo se uma molécula se move de sua posição inicial durante o tempo de difusão  $\Delta$ , então o campo local experimentado pelos spins durante o segundo pulso de gradiente não corresponderá exatamente ao primeiro e somente parte do sinal é refocalizado, obtendo dessa forma um sinal atenuado (CLARIDGE, 2009; HEISEL, GOTO & KRISHNAN, 2012).

**Figura 81:** Sequência de pulsos spin-eco PFGSE (Adaptado: CLARIDGE, 2009)

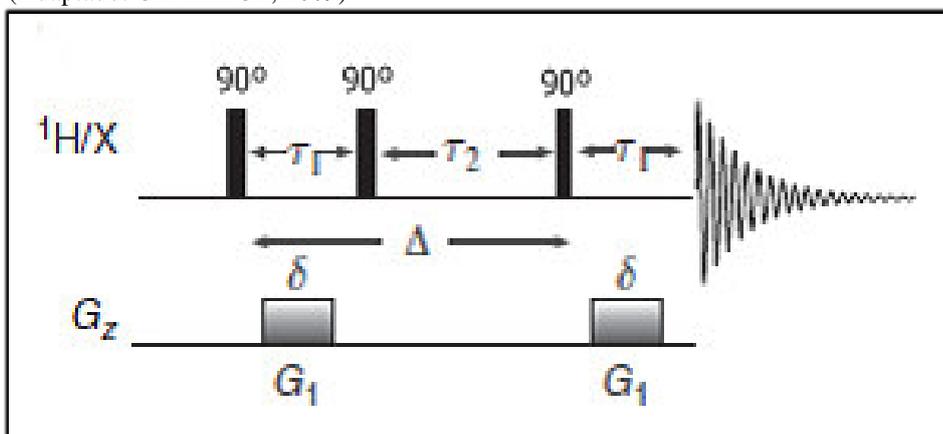


### 7.1.3 Sequencia com eco de spin estimulado (PFGSTE)

A sequência de pulsos que utiliza ecos de spin estimulado (PFGSTE) é uma variação da sequência de ecos de spin (PFGSE) (Figura 82, pág 123). São aplicados três pulsos RF de  $90^\circ$  onde é aplicado um primeiro pulso de gradiente após o primeiro pulso RF de  $90^\circ$  e um

segundo pulso de gradiente após o terceiro pulso RF. Em relação à sequência PFGSE, a técnica com ecos de spin estimulados possui a vantagem no tempo reduzido necessário para a magnetização, o que é imprescindível quando se trata de moléculas grandes em que  $T_2$  é pequeno. Contudo quando  $T_1$  é igual a  $T_2$  se perde amplitude no eco em um fator de 2 em relação ao eco de spin, o que pode indicar uma desvantagem da técnica. No entanto, em quase todas as moléculas o tempo  $T_1$  é maior ou igual a  $T_2$ , as vantagens da sequência PFGSTE superam suas desvantagens e é a mais empregada em medidas de difusão (SOUZA, *et al.*, 2009; VIZZOTTO, 2004).

**Figura 82:** Sequência de pulsos com ecos de spin estimulado PFGSTE  
(Adaptado: CLARIDGE, 2009)



#### 7.1.4 Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY)

A Espectroscopia Ordenada por Difusão - DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) surge como uma ferramenta essencial para análise de misturas complexas. Esta técnica desenvolvida por Morris e Johnson em 1992, é capaz de avaliar a difusão molecular baseada em ecos de spin com gradientes de campo pulsado (PFGSE), utilizando a medida do movimento translacional aleatório de um conjunto de partículas (moléculas ou íons) como consequência de sua energia térmica. Em virtude disso, permite o ordenamento dos deslocamentos químicos das espécies de acordo com seus respectivos coeficientes de difusão (MORRIS & JOHNSON, 1992, 1994; SOUZA *et al.*, 2009; NOVOA-CARBALLAL *et al.*, 2011).

No âmbito de produtos naturais a possibilidade de identificação de substâncias presentes em extratos vegetais antes da separação de seus constituintes, aumenta a eficiência

da química de produtos naturais, especialmente quando alguns dos compostos são sensíveis aos métodos de purificação e propensos a gerar artefatos (produtos de degradação) (RODRIGUES, 2010). Nesse contexto, as técnicas de RMN, são indiscutivelmente as melhores ferramentas para elucidação estrutural de substâncias químicas. Contudo a análise de misturas é uma situação muito complicada, tendo em vista que os espectros frequentemente apresentam sobreposição de sinais o que dificulta o trabalho, uma condição comumente evitada pela purificação da amostra antes da análise por RMN (VIEIRA, 2014; BJORNERAS, 2013).

A técnica DOSY apresenta algumas vantagens como: simplicidade, facilidade no preparo das amostras, além de proporcionar uma separação virtual dos compostos na mistura. Contudo, essa técnica é tipicamente utilizada em misturas com espécies de diferentes tamanhos, ou seja, diferentes raios hidrodinâmicos e diferentes coeficientes de difusão. Mas misturas com espécies de tamanhos similares, como isômeros, a técnica convencional não é o suficiente sendo então impossível a análise do espectro. Uma solução seria o uso de compostos que possam promover uma separação, pela interação das espécies com a matriz.

#### ***7.1.5 Espectroscopia Ordenada por Difusão Assistida por Matriz (MAD)***

Diversas amostras, principalmente de produtos naturais, apresentam um grande número de espécies com tamanhos muito similares. Nesses casos o experimento padrão de DOSY se torna ineficiente, tendo em vista que uma das limitações da técnica é que se os coeficientes de difusão das espécies diferirem por uma fator menor que 2, apenas um sinal aparecerá correspondendo a um valor de coeficiente de difusão médio (VIEIRA, 2014; WU, *et al.*, 1996).

A adição de um co-soluto ou um co-solvente, como surfactantes, pode modificar o comportamento do coeficiente de difusão proporcionando certa liberdade dos sinais, facilitando a interpretação do espectro, num experimento chamado DOSY assistido por matriz (Matrix-Assisted DOSY – MAD). (TORMENA *et al.*, 2010, 2012). Uma vez que a matriz for adicionada à mistura, as interações diferenciais entre a matriz e os demais componentes apresentarão coeficientes de difusão médios que serão mensurados de acordo com equação de Lindman [5].

$$D_M = D_n P_n + D_l P_l \quad [5]$$

Onde  $D_n$  e  $D_l$  correspondem aos coeficientes de difusão em estado livre e ligado a matriz, enquanto  $P_n$  e  $P_l$  correspondem as frações das moléculas ligadas e não-ligadas a matriz (EVANS & DAY, 2013). Algumas das mais utilizadas matrizes em experimentos de MAD são apresentadas abaixo no levantamento bibliográfico.

## 8.0 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

As matrizes utilizadas na técnica de DOSY por difusão assistida, foram encontradas na literatura, após a utilização das palavras, DOSY, MAD e NMR Chromatography, sendo encontrados artigos publicados desde 1994 ao início de 2016 através de pesquisas realizadas no *SciFinder*, *Web of Science* e *Science Direct* (Tabela 30).

**Tabela 30:** Matrizes utilizadas em experimento de MAD

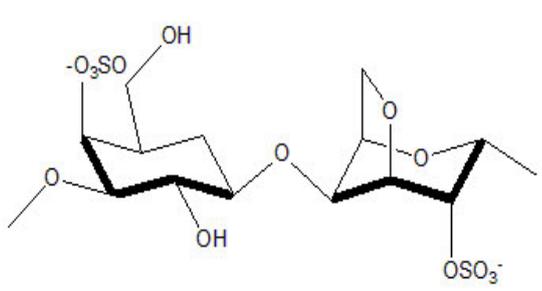
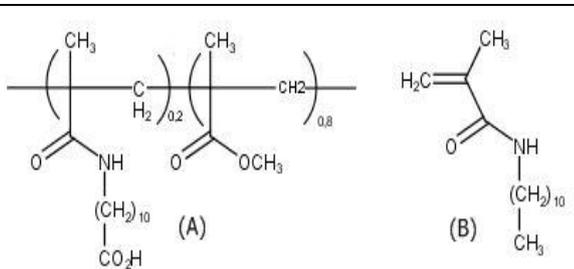
Nº	Matriz	Solvente	Referências
Polímeros			
1	 <p style="text-align: center;">Carragenina (1)</p>	D <sub>2</sub> O	Gostan, <i>et al.</i> , (2004).
2	 <p style="text-align: center;">Polímero de metacrilato (2)</p>	CD <sub>3</sub> OD	Hodge, <i>et al.</i> , (2001).

Tabela continuação.

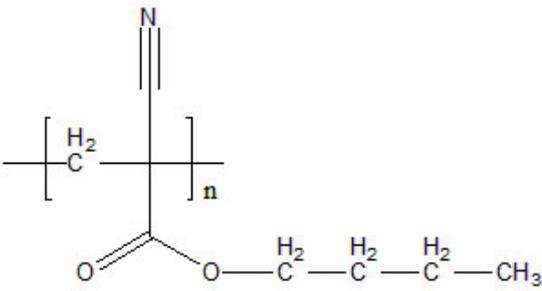
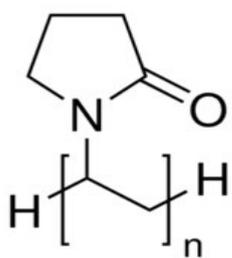
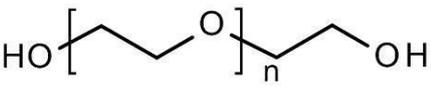
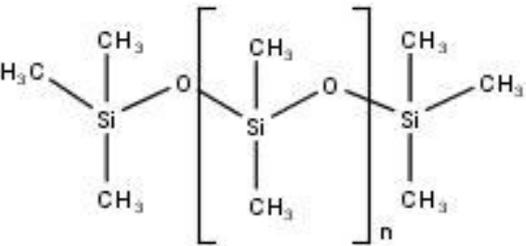
3	 <p>Polibutilcianoacrilato (PBCN) (3)</p>	DMSO-d <sub>6</sub>	Simenova, Rangel e Ivanova, (2013).
4	 <p>Polivinilpirrolidona (PVP) (4)</p>	CDCl <sub>3</sub> DMSO-d <sub>6</sub> D <sub>2</sub> O	Kavakka, <i>et al.</i> , (2009); Hädener, <i>et al.</i> , (2015).
5	 <p>Polietilenoglicol (PEG) (5)</p>	CDCl <sub>3</sub>	Kavakka <i>et al.</i> , (2010).
6	 <p>Polidimetilsiloxano (PDMS) (6)</p>	CDCl <sub>3</sub>	Huang, <i>et al.</i> , (2014).

Tabela continuação

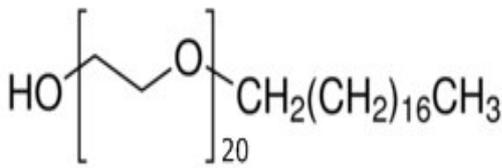
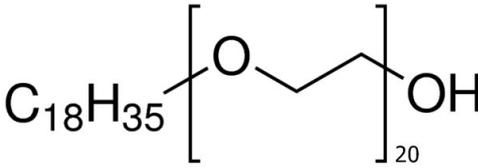
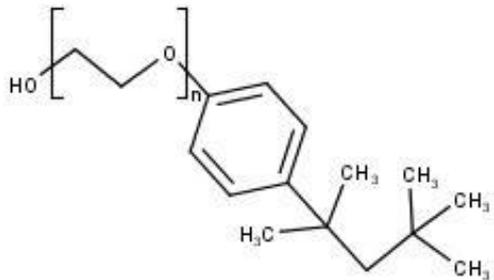
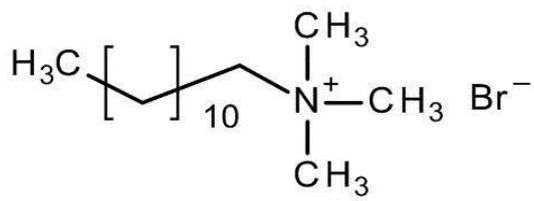
Surfactantes não-iônicos			
7	 <p>Brij 78 (7)</p>	DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 50%  DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 80%	VIEIRA, <i>et al.</i> , (2014).
8	 <p>Brij 98 (8)</p>	DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 50% DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 80%	VIEIRA, <i>et al.</i> , (2014).
9	 <p>Igepal CA-520 (9)</p>	CDCl <sub>3</sub>	Asaro e Savko, (2011).
Surfactantes iônicos			
10	 <p>Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) (10)</p>	D <sub>2</sub> O	Morris, (1994).

Tabela continuação

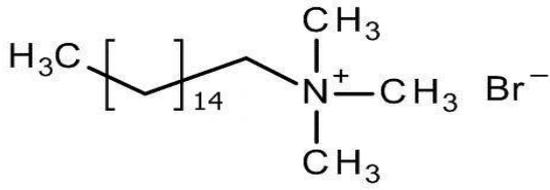
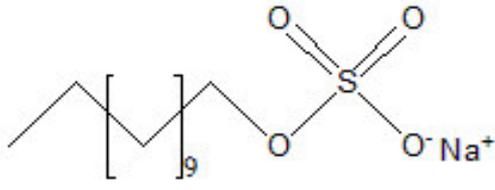
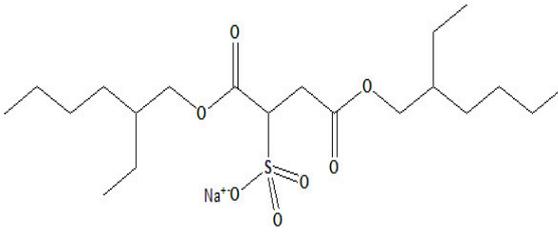
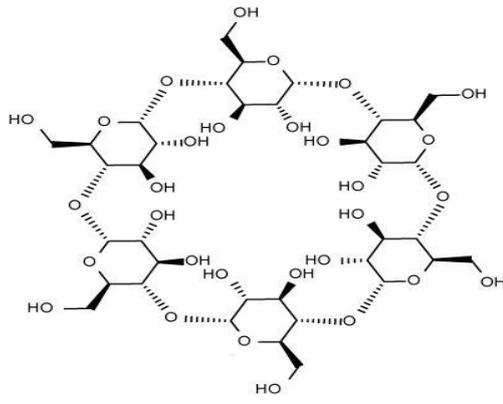
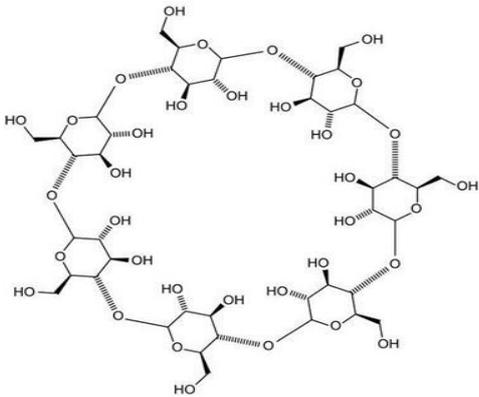
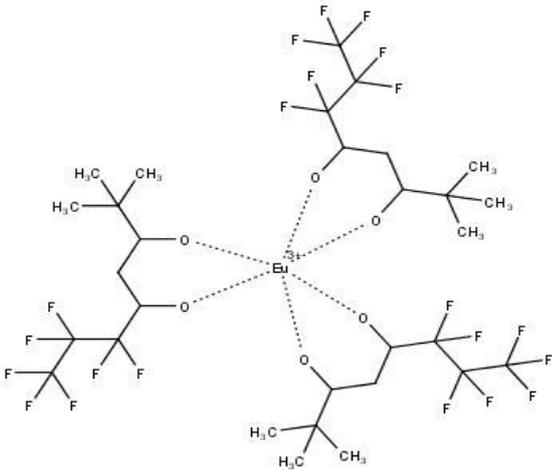
11	 <p>Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (11)</p>	D <sub>2</sub> O	Rogerson, (2013).
12	 <p>Dodecil sulfato de sódio (SDS) (12)</p>	DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 50% DMSO-d <sub>6</sub> / D <sub>2</sub> O 80% D <sub>2</sub> O	Tormena, <i>et al.</i> , (2010); Cassani, Nilsson e Morris, (2012); Álvarez, <i>et al.</i> , (2016).
13	 <p>Diocetil sulfocinato de sódio (AOT) (13)</p>	D <sub>2</sub> O CDCl <sub>3</sub>	Chaudhari e Suryaprakash, (2012); Tormena, <i>et al.</i> , (2012).
<b>Polissacarídeos</b>			
14	 <p><math>\alpha</math> - ciclodextrina (14)</p>	D <sub>2</sub> O	Chaudhari, Srinivasa e Suryaprakash, (2012).

Tabela continuação

15	 <p style="text-align: center;">β – ciclodextrina (15)</p>	D <sub>2</sub> O	Chaudhari, Srinivasa e Suryaprakash, (2013); Adams, <i>et al.</i> , (2011).
Reagentes de deslocamento			
16	 <p style="text-align: center;">Eu(fod)<sub>3</sub></p>	CDCl <sub>3</sub>	Rogerson, <i>et al.</i> , (2011)

## 8.1 Polímeros

### 8.1.1 Carragenina

A carragenina (1), um polímero de polissacarídeo em gel, foi utilizada por Gostan, *et al.*, (2004), como matriz para auxiliar na medida da autodifusão de compostos que conferem aroma aos alimentos, butanoato de etila e linalol em D<sub>2</sub>O.

### 8.1.2 Polímero sintético de metacrilato

O polímero sintético (2A) preparado por Hodge, *et al.*, (2001) a partir de uma reação de copolimerização do monômero metil metacrilato (2B), foi utilizado como matriz em estudos por DOSY para investigar as interações com produtos naturais: colest-5-en-3-ona, (*R*)-(+)-citronelal, (*S*)-(-)-citronelol, hidroquinona, metil nicotinato, *N*-metilnicotinamida, (1*S*)-(-)- $\beta$ -pineno, acetato de 1-6 diidropregnonona, progesterona, *o*-vanilina e estrona, em CD<sub>3</sub>OD.

### 8.1.3 Polibutilcianoacrilato

Outro polímero utilizado em experimentos de DOSY assistido por matriz consiste no polibutilcianoacrilato (PBCN) (3), preparado por Simenova, Rangel e Ivanova (2013) a partir da polimerização do butilcianoacrilato, para promover a separação e imobilização de duas drogas, 5-Fluorouracil (5FU) e Daunorubicina (DAU) em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

### 8.1.4 Polivinilpirrolidona (PVP)

O polímero polivinilpirrolidona (PVP) (4) foi utilizado por Kavakka, *et al.*, (2009) em estudos de Matrix-Assisted DOSY – MAD para promover a separação dos componentes da mistura de álcool benzílico, *p*-metilfenol e *p*-xileno em CDCl<sub>3</sub>.

O polímero PVP também foi usado por Hädener, *et al.*, (2015) em análises de DOSY, no qual a matriz apresenta interação suficiente para funcionar como transporte do fármaco Clorina e6 (CE6) em DMSO-*d*<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O.

### 8.1.5 Polietilenoglicol (PEG)

O polímero polietilenoglicol (PEG) (5) foi utilizado por Kavakka *et al.*, (2010) variando a massa de 200-8.000.000 g mol<sup>-1</sup>, a melhor resolução foi obtida com PEG 16K (16.000 g mol<sup>-1</sup>) como matriz para a resolução de misturas de produtos naturais por DOSY em CDCl<sub>3</sub>.

### **8.1.6 Polidimetilsiloxano (PDMS)**

O polímero polidimetilsiloxano (PDMS) (6) foi utilizado por Huang, *et al.*, (2014), como matriz em experimentos de DOSY, com o objetivo de separar os sinais dos componentes da mistura de propano-1,2-diol, *n*-propanol e óxido de propileno em CDCl<sub>3</sub>.

## **8.2 Surfactantes não-iônicos**

### **8.2.1 Brij 78 e 98**

Os surfactantes não-iônicos da família Brij<sup>®</sup>, Brij 78 (7) e Brij 98 (8), foram utilizados por VIEIRA, *et al.*, (2014) no experimento de MAD, para promover a separação dos componentes de uma mistura de monoterpenos: carvacrol, timol e L-(-)-carvona em 20% DMSO-d<sub>6</sub>/80%D<sub>2</sub>O (v/v) e de uma mistura de flavonoides: fisetina, (+)-catequina e quercetina em 50% DMSO-d<sub>6</sub>/50% D<sub>2</sub>O (v/v), que na ausência de um co-soluto apresentaram coeficientes de difusão semelhantes.

### **8.2.2 Igepal CA-520**

O surfactante não-iônico Igepal CA-520 (9) (Polioxietileno iso-feniloctil éter), foi trabalhado com microemulsão produzindo micelas inversas, sendo utilizado por Asaro e Savko, (2011) para a resolução de uma mistura de vários componentes oligoméricos em CDCl<sub>3</sub>.

## **8.3 Surfactantes iônicos**

### **8.3.1 Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB)**

O uso de matrizes no estudo do tamanho molecular e hidrofobicidade das espécies por DOSY foi relatado por Morris (1994), utilizando brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) (10) como matriz promovendo a separação dos álcoois: metanol, isopropanol, *terc*-butanol e *n*-pentanol em D<sub>2</sub>O.

### 8.3.2 Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)

Outro surfactante iônico de estrutura semelhante ao (DTAB) foi relatado por Rogerson (2013), o qual utilizou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (11) no experimento de DOSY assistido por matriz, com objetivo de promover a separação das espécies, ácido salicílico e aspirina em D<sub>2</sub>O com adição de NaOH 1 mM.

### 8.3.3 Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Um dos surfactantes mais utilizados em análises por MAD no dodecil sulfato de sódio (SDS) (12), que produz micelas normais na presença de água. Um estudo realizado por Tormena, *et al.*, (2010) com os isômeros 1,2-, 1,3- e 1,4- metoxifenol mostrou que os coeficientes de difusão eram semelhantes em D<sub>2</sub>O, enquanto que a adição de SDS como co-soluto resultou na separação destes componentes.

A utilização do SDS como matriz também foi relatado na literatura por Cassani, *et al.*, (2012), para a resolução de uma mistura dos flavonoides, fisetina, (+)-catequina e quercetina dissolvidos em mistura binária de solventes DMSO-d<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O 20% e 50% (v/v).

Flavonoides glicosilados também foram separados por Álvarez, *et al.*, (2016) utilizando SDS numa mistura de solventes DMSO-d<sub>6</sub> /D<sub>2</sub>O 20% (v/v).

### 8.3.4 Dioctil sulfocinato de sódio (AOT)

Um outro surfactante também bastante utilizado em análises por MAD é o dioctil sulfocinato de sódio (AOT) (13), que produz micelas reversas em água. Segundo Chaudhari e Suryaprakash, (2012) a mistura dos isômeros: ácido maléico e ácido fumárico, mostraram o mesmo coeficiente de difusão em D<sub>2</sub>O na ausência de um co-soluto, contudo com a adição de 200mg AOT foi possível separar estes isômeros. O mesmo experimento foi realizado utilizando SDS que forma micelas normais em água, com o objetivo de comparar a eficiência da separação dos sinais dos componentes utilizando micelas normais e reversas.

Outro experimento de MAD contendo AOT como matriz foi realizado por Tormena, *et al.*, (2012), onde foi utilizada a mistura dos isômeros 1,2, 1,3 e 1,4 –metoxifenol em CDCl<sub>3</sub>, obtendo a separação dos mesmos.

## 8.4 Oligossacarídeos

### 8.4.1 $\alpha$ e $\beta$ – ciclodextrina

Os oligossacarídeos  $\alpha$ - e  $\beta$ - ciclodextrina (14) e (15), foram relatadas na literatura como matrizes quirais na resolução por DOSY. Chaudhari, Srinivasa e Suryaprakash, (2013) utilizaram esses compostos como co-solutos com objetivo de separar os sinais dos isômeros dos ácidos aminobenzóicos, ácidos benzenodicarboxílicos e os isômeros *cis* e *trans*-ácido maléico e fumárico em D<sub>2</sub>O.

Outro trabalho relatado utilizando  $\beta$  – ciclodextrina (15) como matriz quiral foi realizado por Adams, *et al.*, (2011). Foi utilizada uma mistura de epímeros da arginina num experimento de DOSY em D<sub>2</sub>O, onde a  $\beta$  – ciclodextrina revelou ser uma matriz eficiente na resolução de misturas de estereoisômeros.

## 8.5 Reagentes de deslocamento

### 8.5.1 $Eu(fod)_3$

O uso do reagente de deslocamento em experimento de difusão por RMN é utilizado para remover sobreposição de sinais das espécies presentes na amostra, pois perturbam as propriedades magnéticas dos solutos em RMN e dependendo do complexo as ressonâncias podem causar proteção ou desproteção. São geralmente utilizados íons lantanídeos com ligantes orgânicos (VIEIRA, 2010).

O reagente de deslocamento Európio (III) tris (6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-dimetil-3,5-octanedionato) –  $Eu(fod)_3$  (16), foi empregado por Rogerson, *et al.*, (2011) para a resolução de misturas por MAD, utilizando uma mistura contendo *n*-hexano, hexan-1-ol e *n*-heptanal em CDCl<sub>3</sub> que com adição de  $Eu(fod)_3$  foi possível promover a separação dos sinais dos componentes da mistura.

## 9.0 SURFACTANTES BRIJ®

O termo surfactant surgiu da combinação das palavras “surface active agent”, em geral são moléculas de alto peso molecular que apresentam em sua estrutura regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Uma das características principais dos surfactantes é a capacidade de suas moléculas se agregarem e formarem micelas (SEEDHOUSE, 2008).

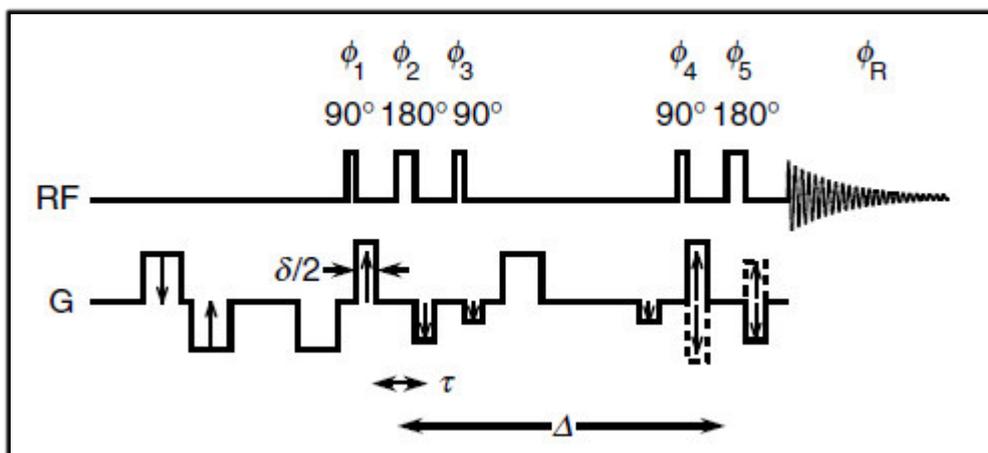
A superfície de atividade de um surfactante está relacionada à sua hidrofobicidade, em uma série homóloga de surfactantes, a formação de micelas se torna mais fácil com o aumento da hidrofobicidade (SOWMYIA, *et al.*, 2010).

O Brij é um tipo de surfactante não iônico contendo em sua estrutura, uma região hidrofílica composta por um variado número de grupos polioxietileno (POE), e outra região composta de uma cadeia hidrofóbica de polimetileno. O processo de micelização do Brij é formado através de agregados premicelares resultando numa progressiva mudança no micro ambiente das micelas. Seu uso é de grande interesse farmacológico por possuírem baixa toxicidade, tendo alguns deles, por exemplo, mostrando baixa ou nenhuma toxicidade ocular (SOWMIYA, *et al.*, 2010; RIBEIRO, *et al.*, 2012; KAPOOR, *et al.*, 2009).

## 10.0 EXPERIMENTOS DE DOSY

Todos os experimentos de DOSY foram realizados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na Universidade Federal do Ceará, nos espectrômetros Bruker Avance DPX 300 MHz e DRX 500 MHz. Os experimentos foram realizados à temperatura de 25° C e utilizando 0,6 mL de solvente assim como na mistura binária. A sequência de pulsos One-shot (Figura 83, pág 135) (PELTA, *et al.*, 2002) foi utilizada com um pulso de gradiente ( $\delta$ ) variando de 1,5 – 2,5 ms, um intervalo de difusão ( $\Delta$ ) 200 ms e a amplitude do gradiente variando de 5 a 80%, com um TD de 16 e ns 16. O coeficiente de difusão foi expresso em  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  e o espectro referenciado pelo sinal dos solventes  $\text{CDCl}_3$  (7.27 ppm) e  $\text{DMSO-d}_6$  (2.5 ppm). O processamento dos dados foi realizado utilizando o programa Dosy Toolbox (NILSSON, 2009).

**Figura 83:** Sequência de pulsos One-shot (FONTE: PELTA, *et al.*, 2002)



### 10.1 Resolução de misturas por DOSY

A técnica DOSY permite uma “separação virtual” dos componentes de uma mistura, desde que os coeficientes de difusão dos mesmos sejam diferentes e não apresente sobreposição de sinais (ADAMS, *et al.*, 2011).

O óleo essencial da alfavaca roxa (OEAR) *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*, obtido por hidrodestilação (Fluxograma 6, pág 108), foi selecionado para análise por DOSY. O cromatograma de CG-EM (Figura 66, pág 106) revelou a presença dos compostos eugenol e  $\beta$ -cariofileno como majoritários. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 68, pág 107) mostra os sinais dos respectivos compostos. Com o intuito de identificar esses compostos na mistura por RMN, sem a necessidade do isolamento, utilizou-se técnica DOSY para promover a separação dos sinais desses compostos. O espectro de RMN DOSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) com 1,0 mg de OEAR (Figura 84, pág 137), mostrou uma separação dos sinais do eugenol e do  $\beta$ -cariofileno com variação percentual do valor de coeficiente de difusão de ( $\Delta\text{EC}$ ) 7,27% (Tabela 31, pág 136). Tendo em vista que os dois compostos possuem estrutura e peso molecular diferente, a separação já era esperada. O experimento de RMN DOSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 85, pág 137) também foi realizado com 1,0 mg de cada componente que foram previamente isolados, eugenol e  $\beta$ -cariofileno (Item 6.3, pág 107 e Item 6.4, pág 109), os coeficientes de difusão encontrados mostraram uma variação percentual ( $\Delta\text{EC}$ ) de 9,39% (Tabela 31, pág 136).

A mudança de solvente altera a dinâmica da solução, que pode ser útil para gerar uma melhor separação de sinais em experimentos de DOSY (VIEIRA, 2014), e para obter uma melhor separação, optou-se por usar uma mistura binária de solventes  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  1:1 (v/v). O DMSO por ser um solvente com maior viscosidade, diminui os efeitos causados pelas

correntes de convecção ocasionadas pelo gradiente de temperatura produzido na amostra, o  $\text{CDCl}_3$  por ser um solvente menos viscoso e mais volátil, é mais susceptível a variação de temperatura podendo alterar os valores de coeficiente de difusão (SOUZA, *et al.*, 2009).

O espectro de RMN DOSY (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  1:1) com 1,0 mg de OEAR (Figura 86, pág 138), revelou uma separação mais eficiente dos sinais utilizando a mistura binária de solventes, apresentando uma variação percentual de ( $\Delta\text{EC}$ ) 89,12% (Tabela 31, pág 141). O espectro de RMN DOSY (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  1:1) (Figura 87, pág 138) com 1,0 mg de  $\beta$ -cariofileno e eugenol isolados, mostrou uma separação ainda mais eficiente, resultando em uma variação percentual ( $\Delta\text{EC}$ ) de 98,33% (Tabela 31). A utilização de  $\text{D}_2\text{O}$  se deu perante uma possível necessidade do uso de uma matriz para promover uma separação dos sinais, que na presença de água poderia formar micelas, contudo a técnica DOSY padrão foi suficiente para a uma separação aceitável.

**Tabela 31:** Coeficientes de difusão ( $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) em  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  1:1 para o eugenol e  $\beta$ -cariofileno no óleo OEAR e isolados.

Amostras	Coeficiente de difusão		( $\Delta\text{EC}$ %)*
	Eugenol	$\beta$ -Cariofileno	
OEAR ( $\text{CDCl}_3$ )	$17,41226 \pm 0,04854$	$16,14553 \pm 0,08439$	7,27
Eugenol + $\beta$ -Cariofileno ( $\text{CDCl}_3$ )	$12,94408 \pm 0,08261$	$11,72763 \pm 0,07119$	9,39
OEAR ( $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1)	$1,81429 \pm 0,00403$	$0,19738 \pm 0,02297$	89,12
Eugenol + $\beta$ -Cariofileno ( $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1)	$2,04108 \pm 0,01614$	$0,03389 \pm 0,03866$	98,33

\*variação percentual

Figura 84: Espectro de RMN DOSY (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) com 1,0 mg de OEAR

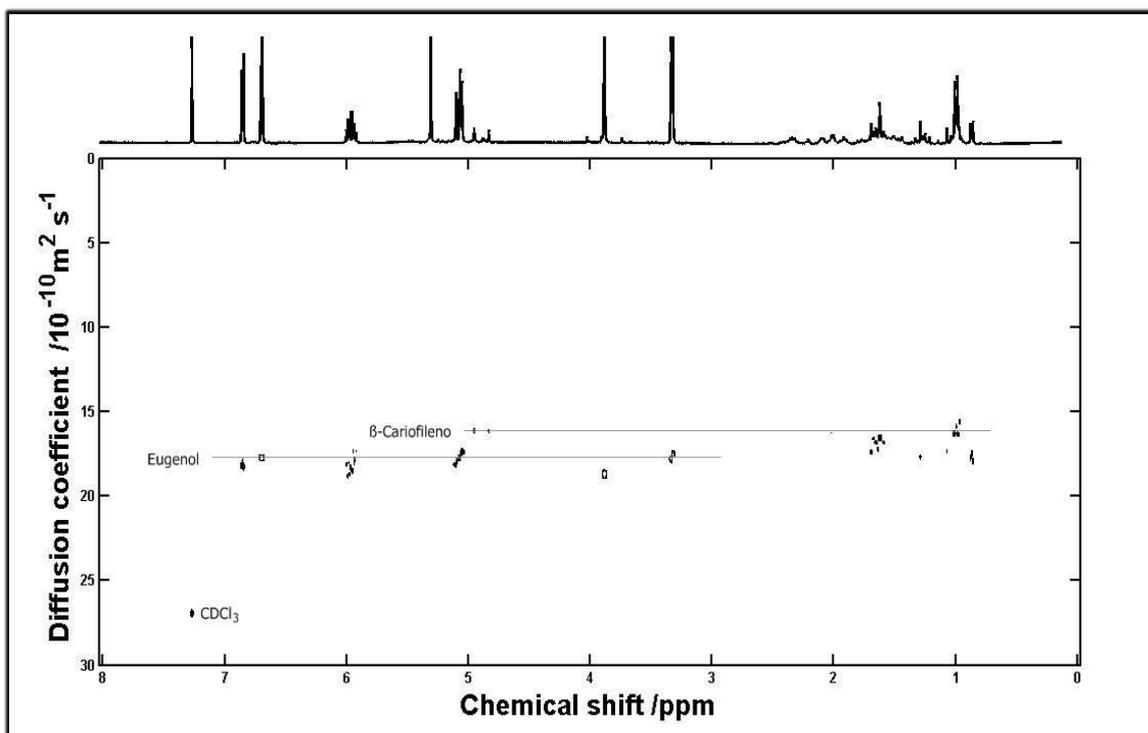


Figura 85: Espectro de RMN DOSY (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) com 1,0 mg de  $\beta$ -cariofileno e eugenol

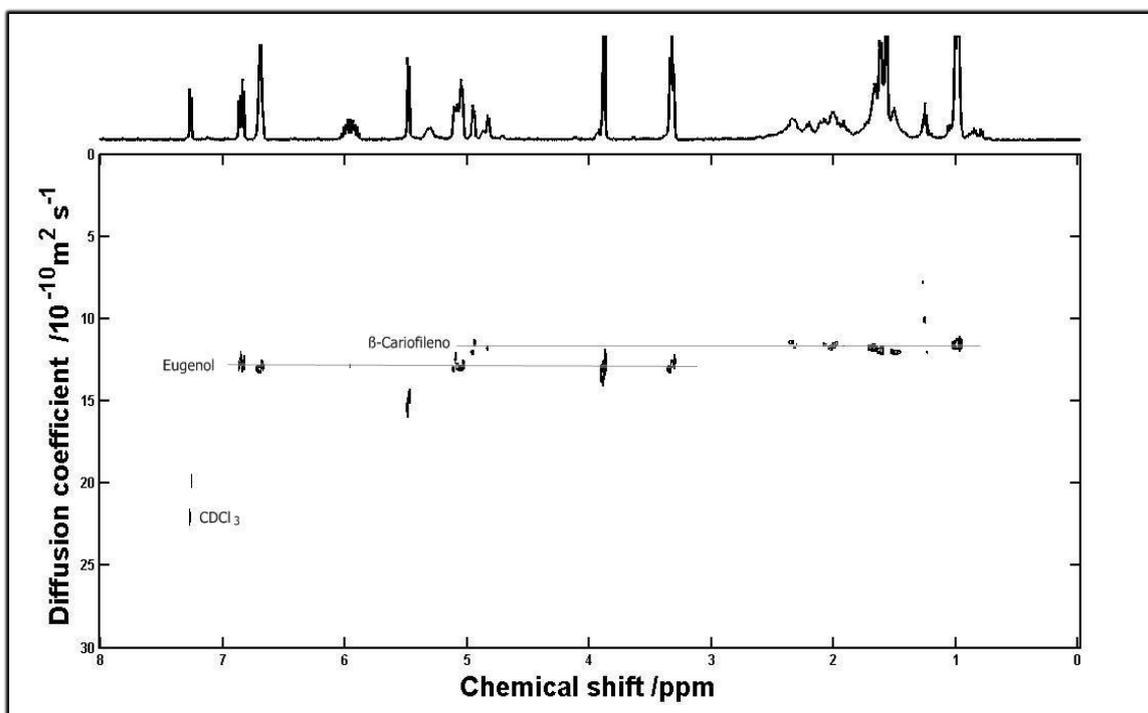


Figura 86: Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com 1,0 mg de OEAR

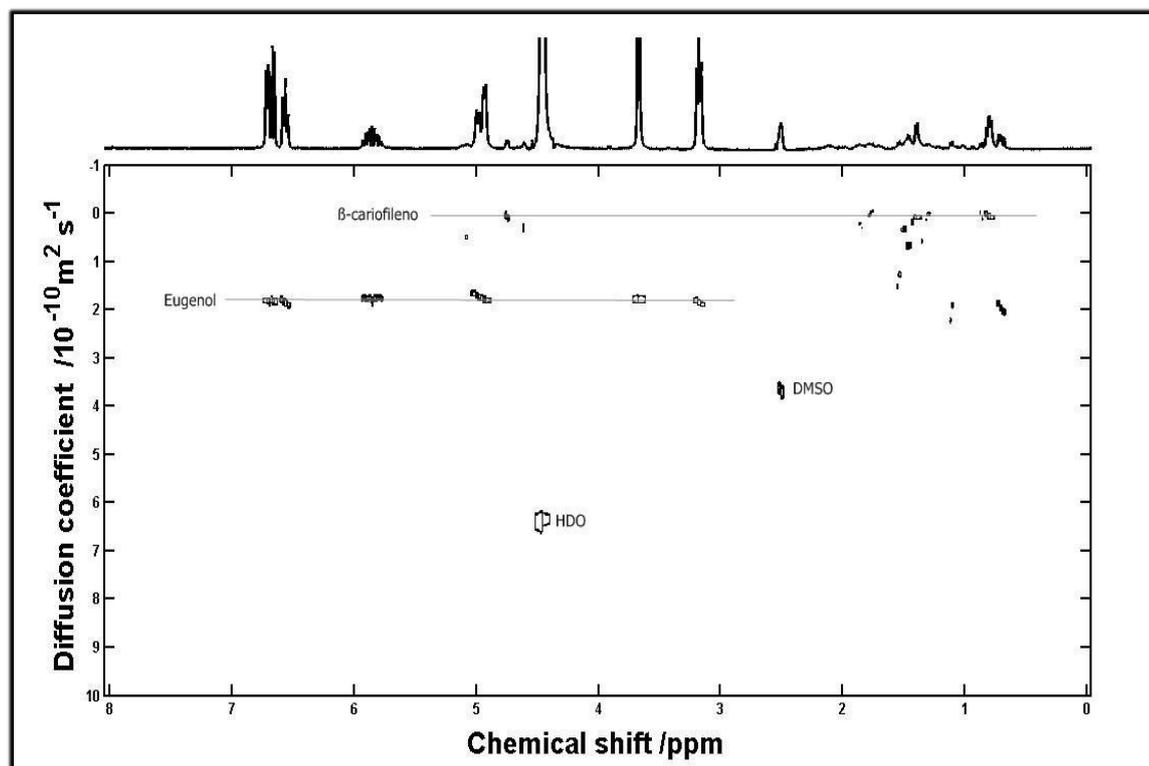
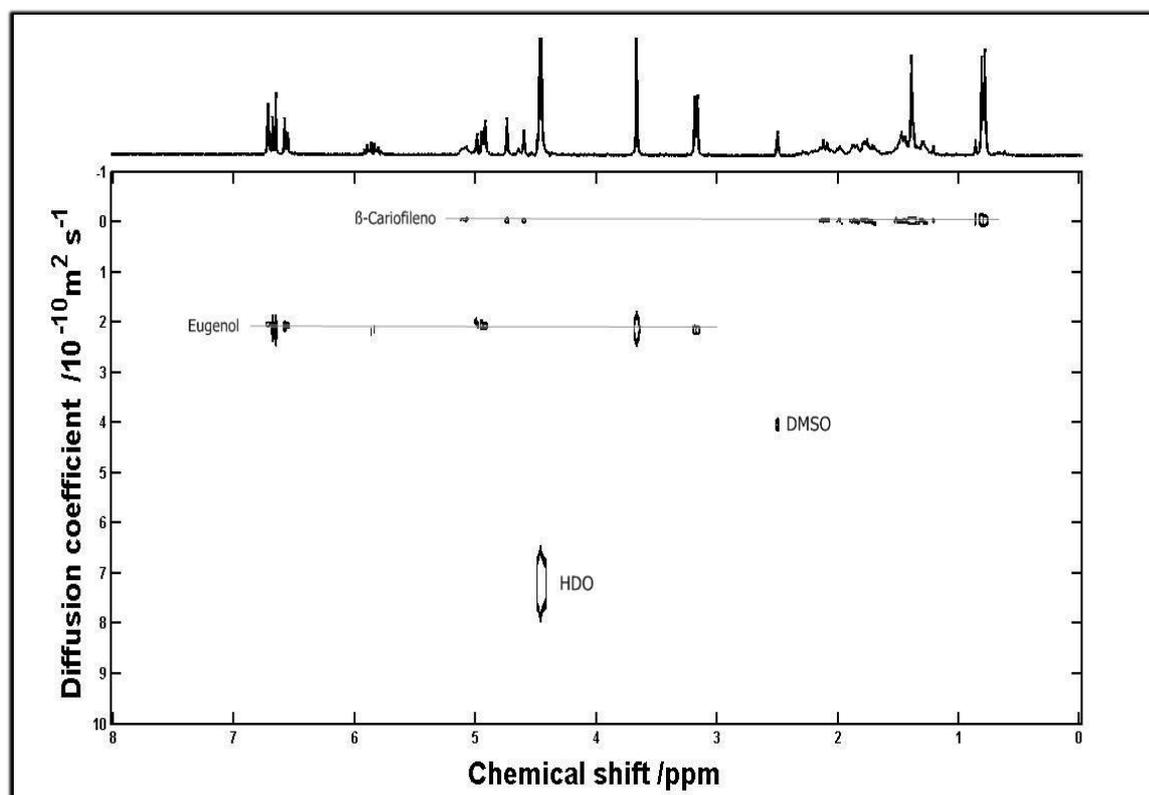


Figura 87: Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com 1,0 mg de  $\beta$ -cariofileno e eugenol



## 10.2 Resolução de misturas por MAD utilizando Brij 78 como matriz

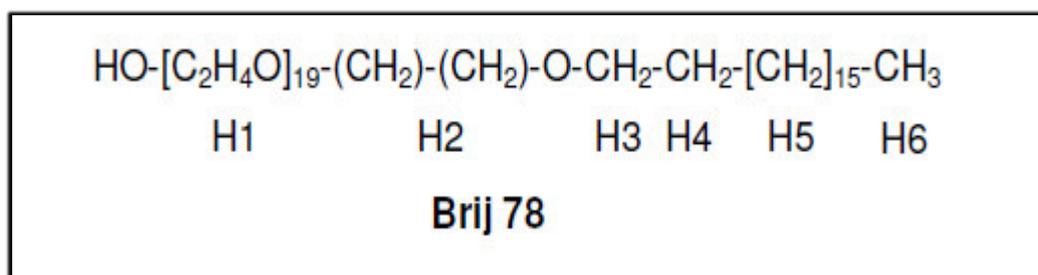
O estudo de MAD foi realizado com o eugenol obtido a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (Item 6.3 pág 107), que foi submetido a reações para obtenção de derivados, acetilação (Item 6.5, pág 111) e isomerização (Item 6.6, pág 113), obtendo o composto acetato de eugenila (Figura 74, pág 113) e os isômeros *cis* e *trans*-isoeugenol (Figura 79, pág 118) respectivamente. O composto vanilina foi integrado aos estudos de MAD por apresentar uma estrutura semelhante a do eugenol.

### 10.2.1 Eugenol e vanilina (EVA)

De início preparou-se uma mistura de eugenol e vanilina, denominada de EVA, numa concentração de 10 mM em uma mistura binária de solventes DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O 1:1 (v/v), e submetida a uma análise de DOSY. O espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O 1:1) de EVA 10 mM (Figura 90, pág 141), revelou valores de coeficientes de difusão próximos com uma variação percentual ( $\Delta$ EVA) de apenas 1,08% (Tabela 32, pág 140), logo a técnica de DOSY padrão não foi capaz de separar os sinais.

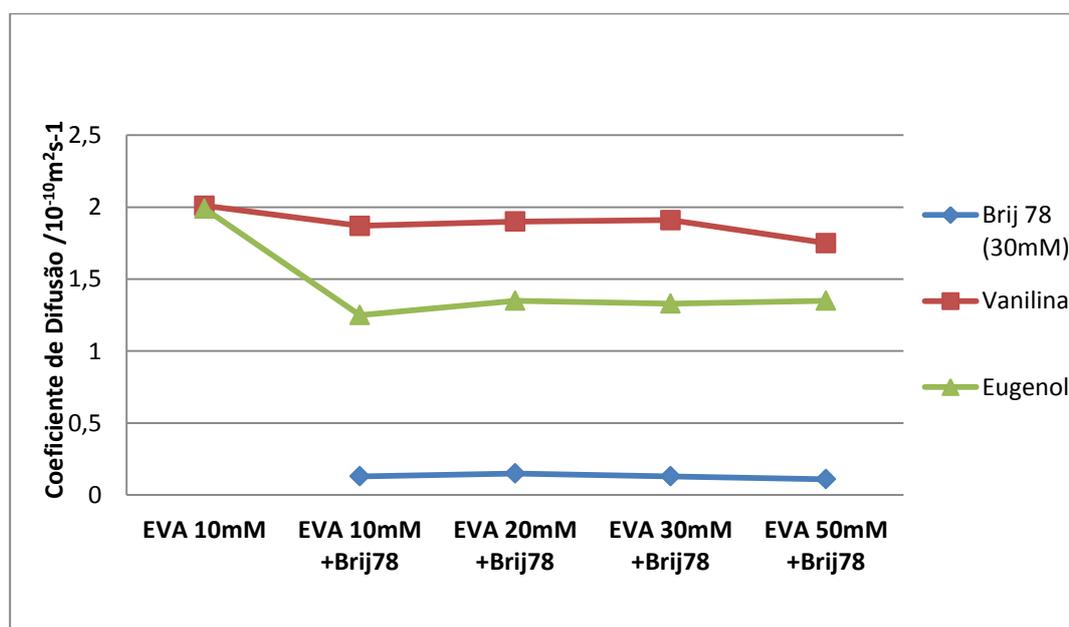
Adicionando a matriz Brij 78 (Figura 88, pág 140) na concentração de 30 mM, observou-se uma interação do Brij 78 com os compostos resultando na separação dos sinais. O espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O 1:1) (Figura 91, pág 141) com EVA 10 mM e Brij 78 30 mM revelou uma variação percentual ( $\Delta$ EVA) nos valores de coeficiente de difusão de eugenol e vanilina em torno de 34,52% (Tabela 32, pág 140).

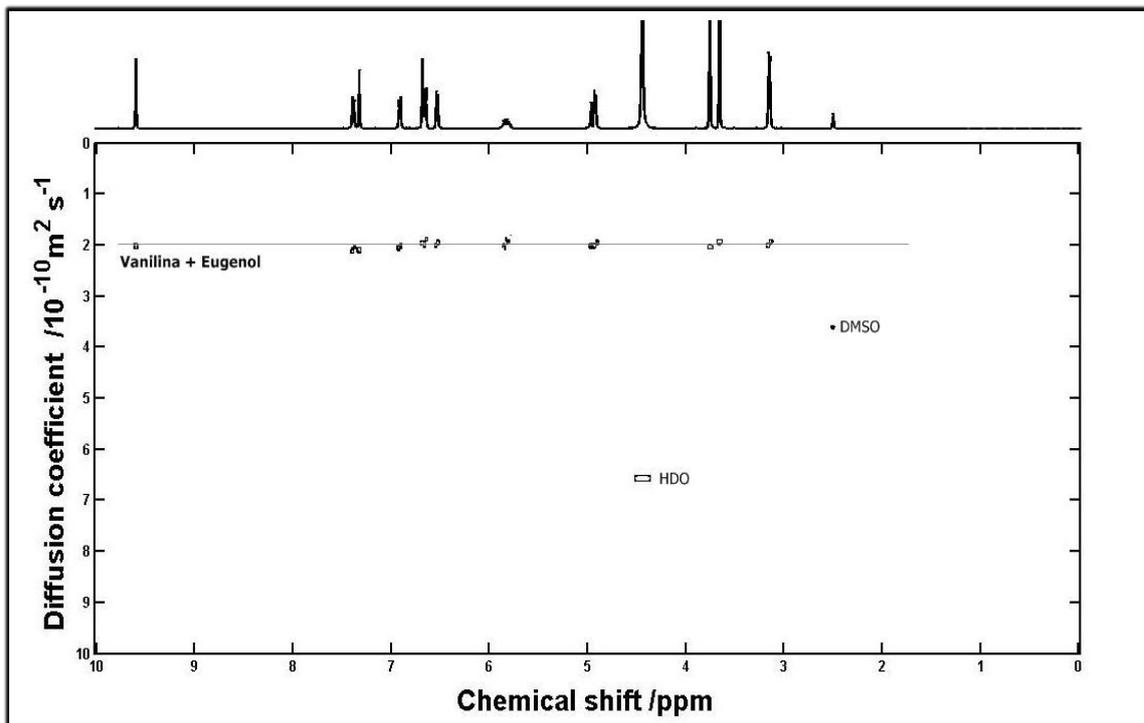
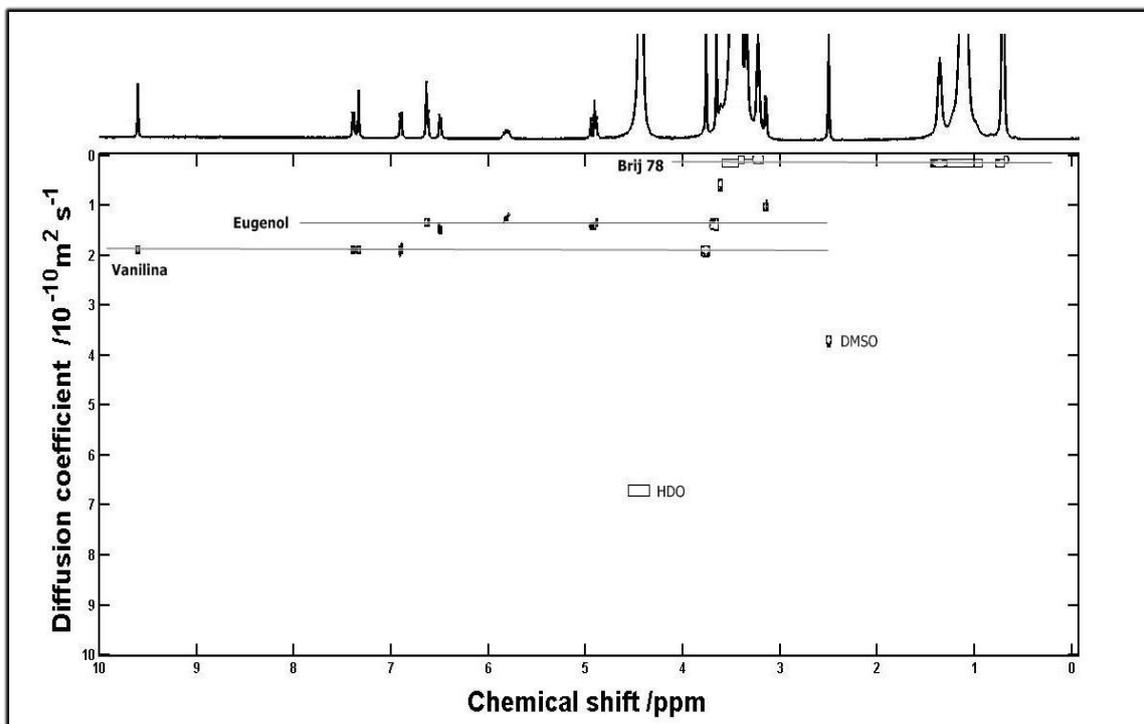
Com o objetivo de estabelecer uma concentração ideal dos compostos assim como do Brij 78 que promova o melhor percentual de separação, os experimentos de MAD foram realizados variando a concentração de eugenol e vanilina em 10, 20, 30 e 50 mM e mantendo constante a concentração de Brij 78 em 30 mM (Figuras 91 a 94, págs 141 a 143). Embora a variação percentual obtida nos experimentos tenham sido próximas, a concentração de 10mM mostrou a separação mais eficiente (Tabela 32, pág 140). A Figura 89 (pág 140) representa o gráfico dos valores de coeficiente de difusão variando a concentração de eugenol e vanilina (EVA).

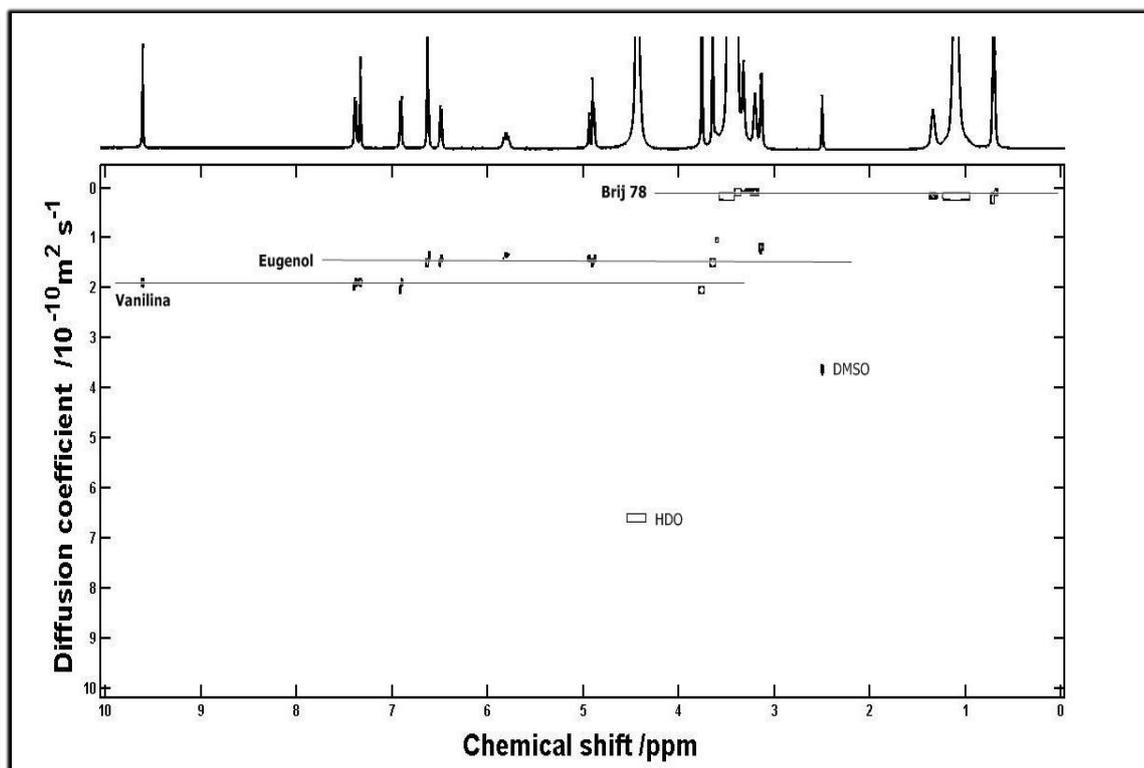
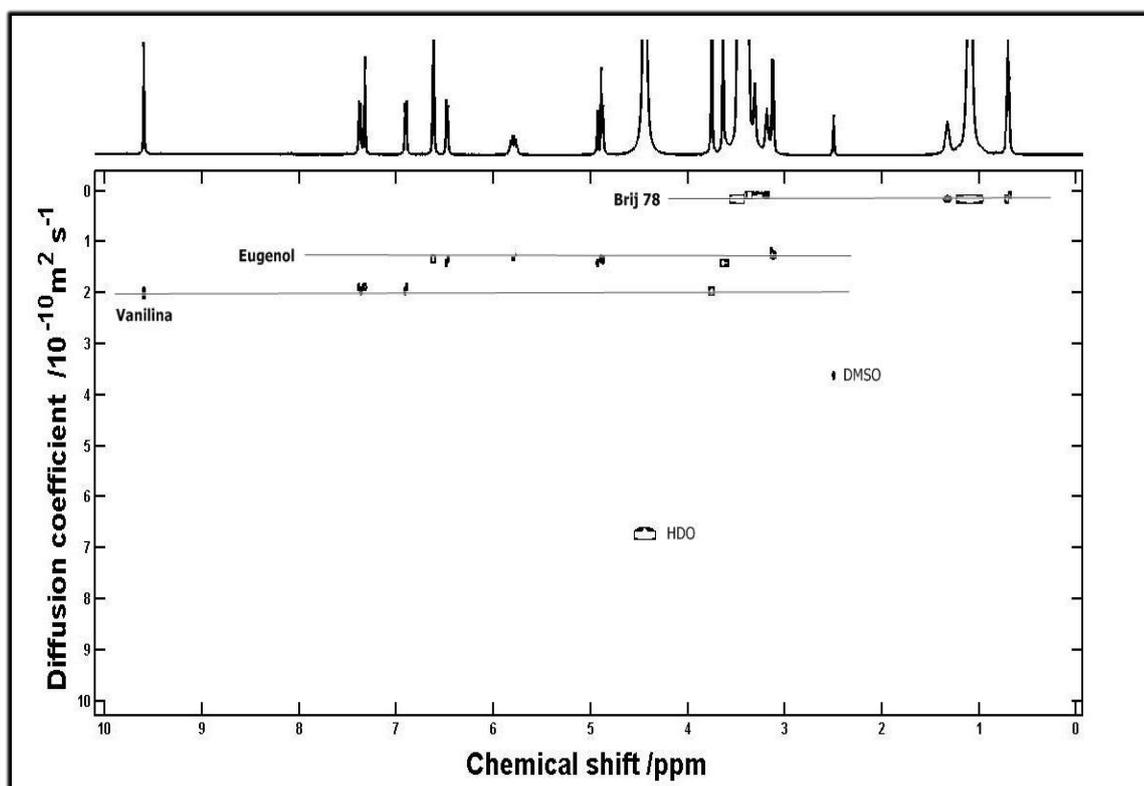
**Figura 88:** Surfactante Brij 78**Tabela 32:** Coeficientes de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O 1:1 variando a concentração de eugenol e vanilina

EVA	Coeficiente de difusão			$(\Delta\text{EVA } \%)^*$
	Eugenol	Vanilina	Brij 78 30mM	
10mM	$1,99 \pm 0,00381$	$2,01 \pm 0,00801$	-	1,08
<b>10mM</b>	<b><math>1,25 \pm 0,02258</math></b>	<b><math>1,87 \pm 0,00438</math></b>	<b><math>0,13 \pm 0,00137</math></b>	<b>34,52</b>
20mM	$1,35 \pm 0,00695$	$1,90 \pm 0,00549$	$0,15 \pm 0,00149$	28,62
30mM	$1,33 \pm 0,00570$	$1,91 \pm 0,00206$	$0,13 \pm 0,00100$	30,25
50mM	$1,35 \pm 0,00829$	$1,75 \pm 0,00814$	$0,11 \pm 0,00095$	22,8

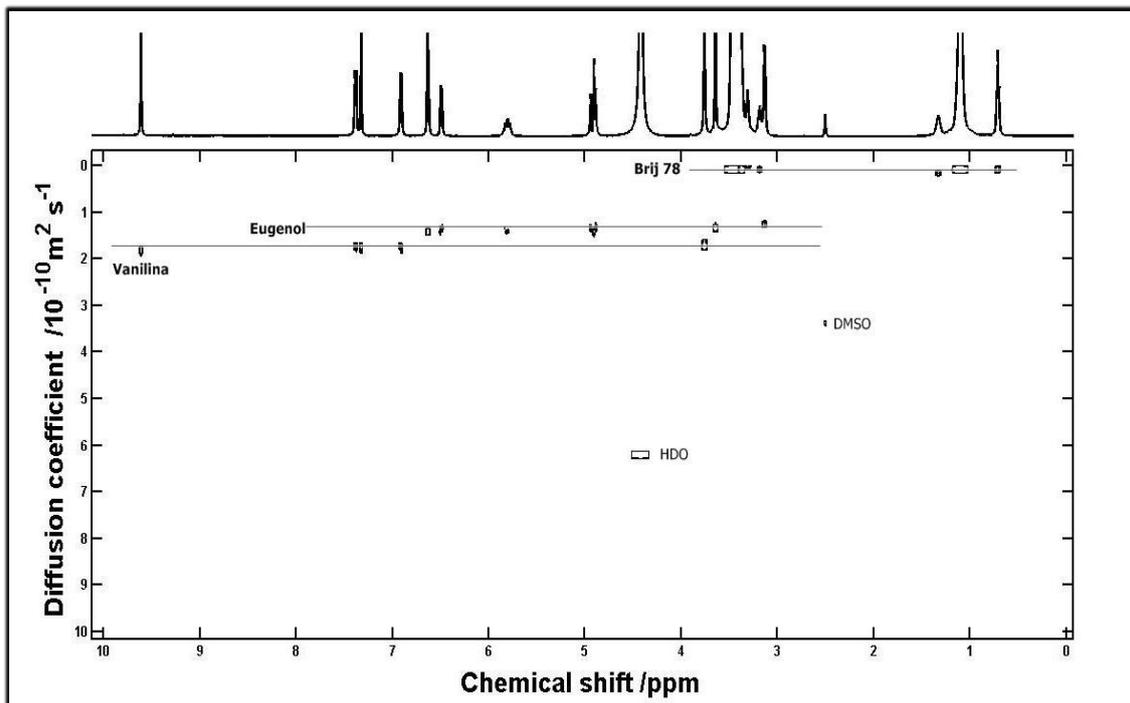
\* variação percentual

**Figura 89:** Valores do coeficiente de difusão ( $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O 1:1 do eugenol, vanilina e Brij 78 variando a concentração de eugenol e vanilina

**Figura 90:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com 10 mM de EVA**Figura 91:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 30mM

**Figura 92:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com EVA 20mM e Brij 78 30mM**Figura 93:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com EVA 30mM e Brij 78 30mM

**Figura 94:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com EVA 50mM e Brij 78 30mM



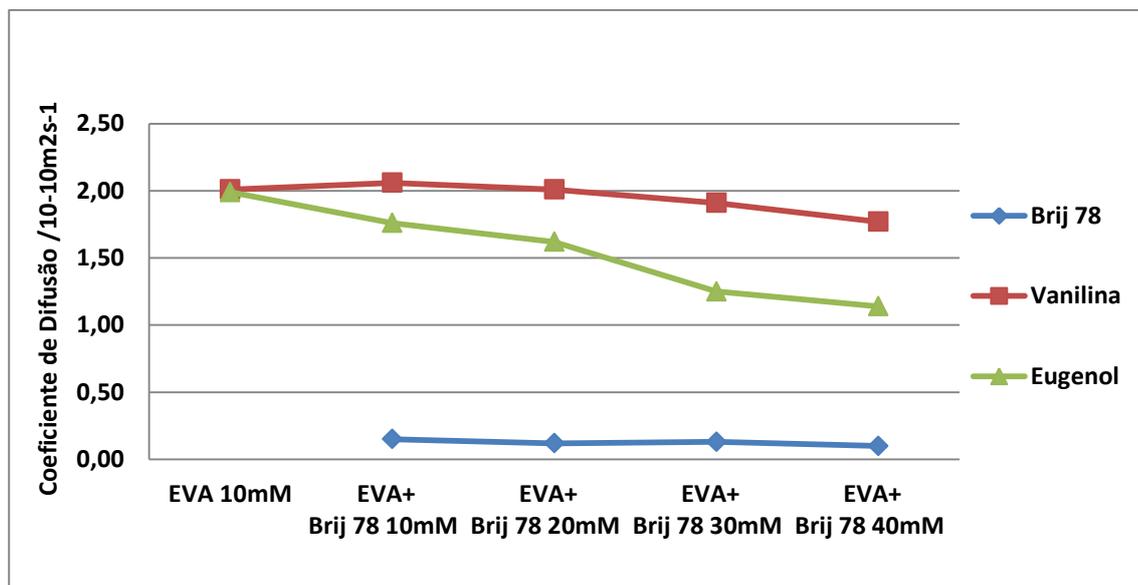
Na concentração de 10 mM a separação dos sinais dos compostos se mostrou a mais eficiente, contudo a concentração da matriz na mistura também pode influenciar na separação. Foram realizados experimentos de MAD variando a concentração de Brij 78 em 10, 20,30 e 40 mM, permanecendo constante a concentração de eugenol e vanilina em 10 mM (Figuras 96 a 98, págs 144 e 145). A melhor resolução dos sinais foi obtida com 40 mM de Brij 78 apresentando uma variação percentual ( $\Delta\text{EVA} \%$ ) de 35,30% (Tabela 33). O eugenol mostrou uma maior interação com a matriz, pois apresentou uma variação maior em seu coeficiente de difusão. A Figura 95 representa o gráfico dos valores de coeficiente de difusão variando a concentração de Brij 78.

**Tabela 33:** Coeficientes de difusão ( $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1 para o eugenol, vanilina e Brij 78 variando a concentração de Brij 78

Brij 78	Coeficiente de Difusão			$(\Delta\text{EVA} \%)^*$
	Eugenol	Vanilina	Brij 78	
-	$1,99 \pm 0,00381$	$2,01 \pm 0,00801$	-	1,08
10mM	$1,76 \pm 0,01390$	$2,06 \pm 0,01205$	$0,15 \pm 0,00193$	14,56
20mM	$1,62 \pm 0,01818$	$2,01 \pm 0,00851$	$0,12 \pm 0,00122$	19,27
30mM	$1,25 \pm 0,02258$	$1,91 \pm 0,00438$	$0,13 \pm 0,00137$	34,52
<b>40mM</b>	<b><math>1,14 \pm 0,05429</math></b>	<b><math>1,77 \pm 0,00616</math></b>	<b><math>0,10 \pm 0,00042</math></b>	<b>35,30</b>

\*variação percentual

**Figura 95:** Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1 do eugenol e vanilina 10mM e Brij 78 variando a concentração de Brij 78



**Figura 96:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 10mM

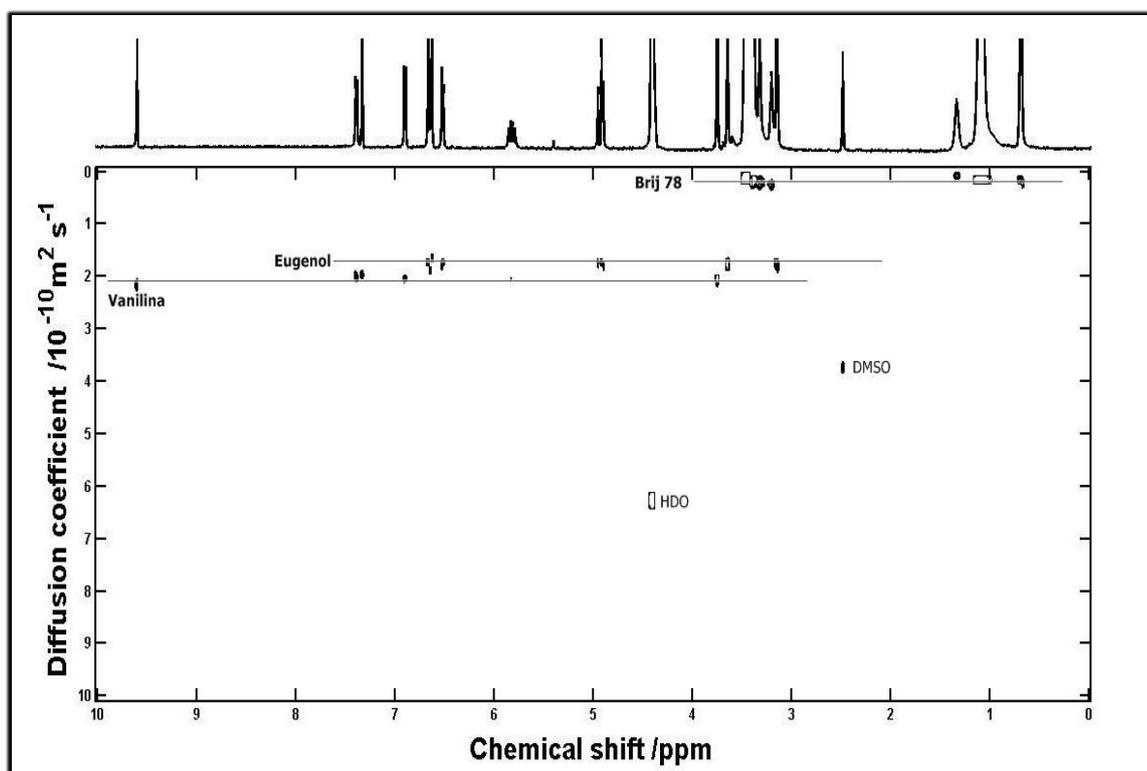


Figura 97: Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 20mM

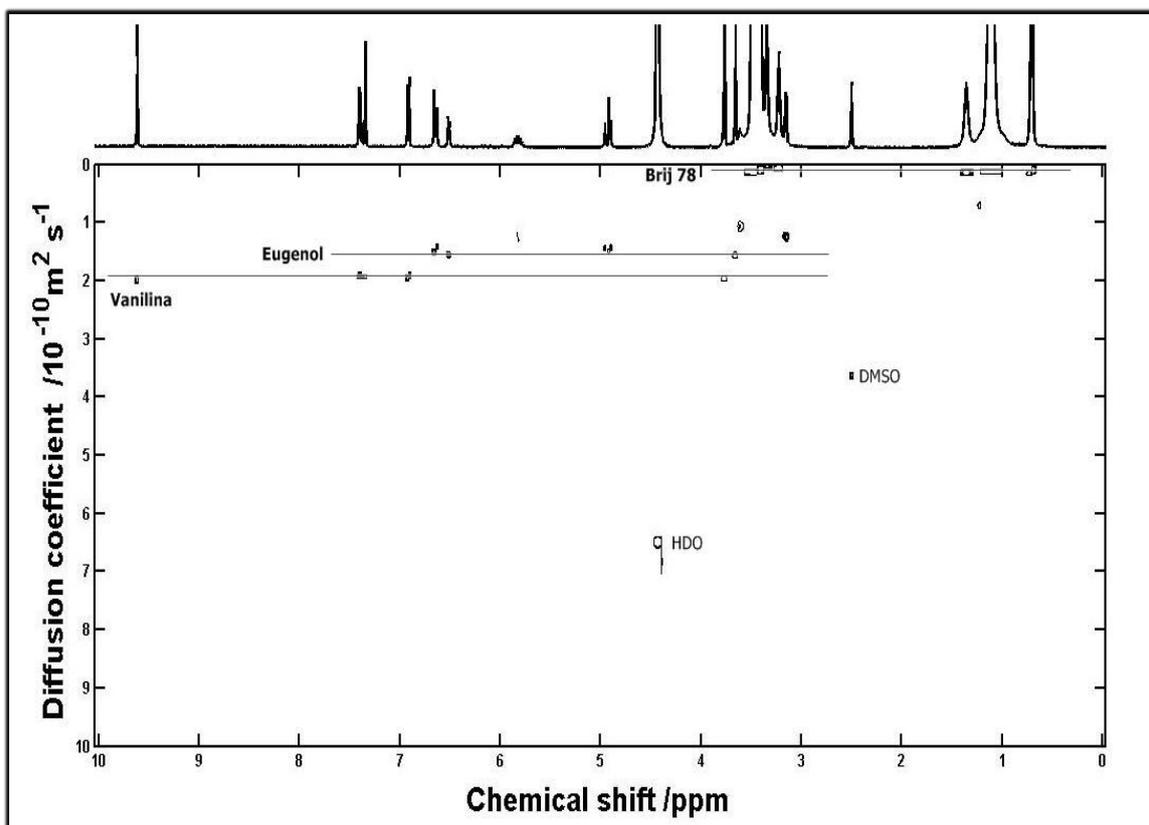
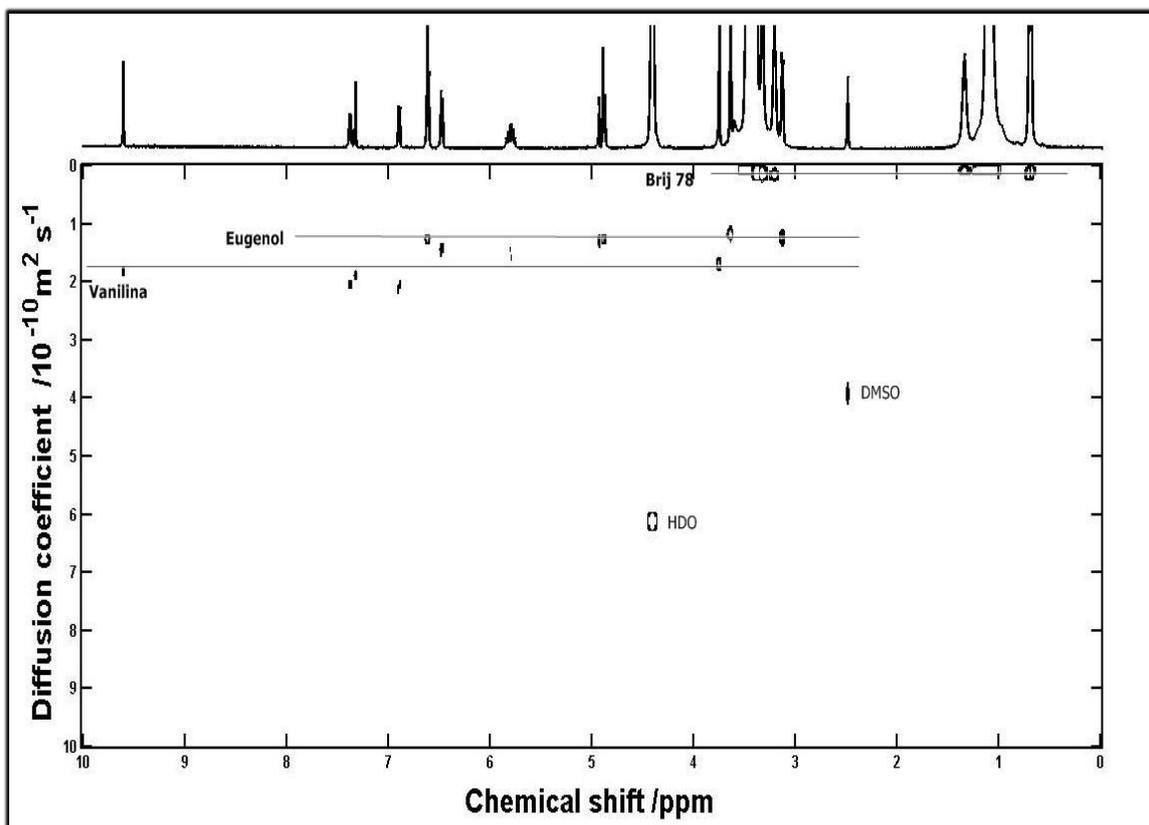


Figura 98: Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) com EVA 10mM e Brij 78 40mM



Os demais experimentos de MAD foram realizados utilizando no mínimo 40mM de matriz Brij 78, em vista que nessa concentração foi obtido melhores resultados.

### 10.2.2 Eugenol, vanilina e acetato de eugenila (EVAc)

O composto acetato de eugenila (Figura 74, pág 113) foi obtido pela reação de acetilação do eugenol (Item 6.5, pág 111), enquanto o composto vanilina foi obtido comercialmente pela Dinâmica.

A mistura dos compostos eugenol, vanilina e acetato de eugenila foi denominada (EVAc). O espectro DOSY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) (Figura 100, pág 147) de EVAc, com 1,0 mg de cada composto, revelou uma pequena variação nos valores de coeficiente de difusão dos mesmos, mostrando uma variação percentual ( $\Delta$ EVAc) de até 13,79% (Tabela 34), logo a técnica padrão de DOSY foi o suficiente para separação.

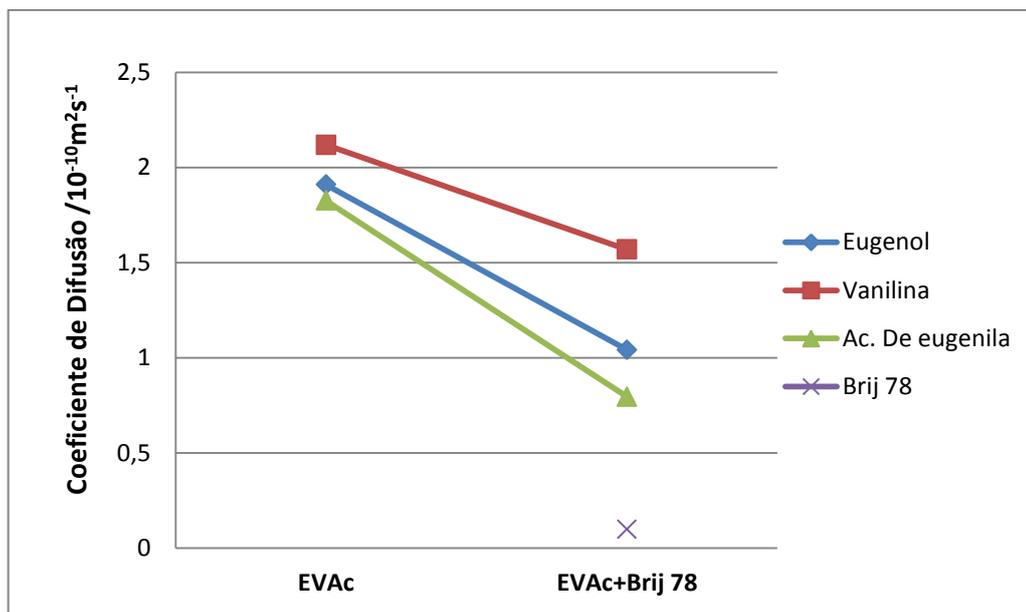
Com o objetivo de melhorar a separação, realizou um experimento DOSY com adição de 40 mM de Brij 78. O espectro DOSY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) de EVAc com adição de matriz (Figuras 101, pág 148), revelou uma melhor resolução nos sinais dos compostos, ou seja, houve um aumento na variação percentual ( $\Delta$ EVAc) dos valores de coeficiente de difusão. De acordo com os valores obtidos, os compostos eugenol e acetato de eugenila apresentaram maior interação com a matriz, sofrendo uma variação maior em seus coeficientes de difusão (Figura 99) e (Tabela 34).

**Tabela 34:** Coeficientes de difusão ( $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1 para o eugenol, vanilina e acetato de eugenila com e sem adição de Brij 78

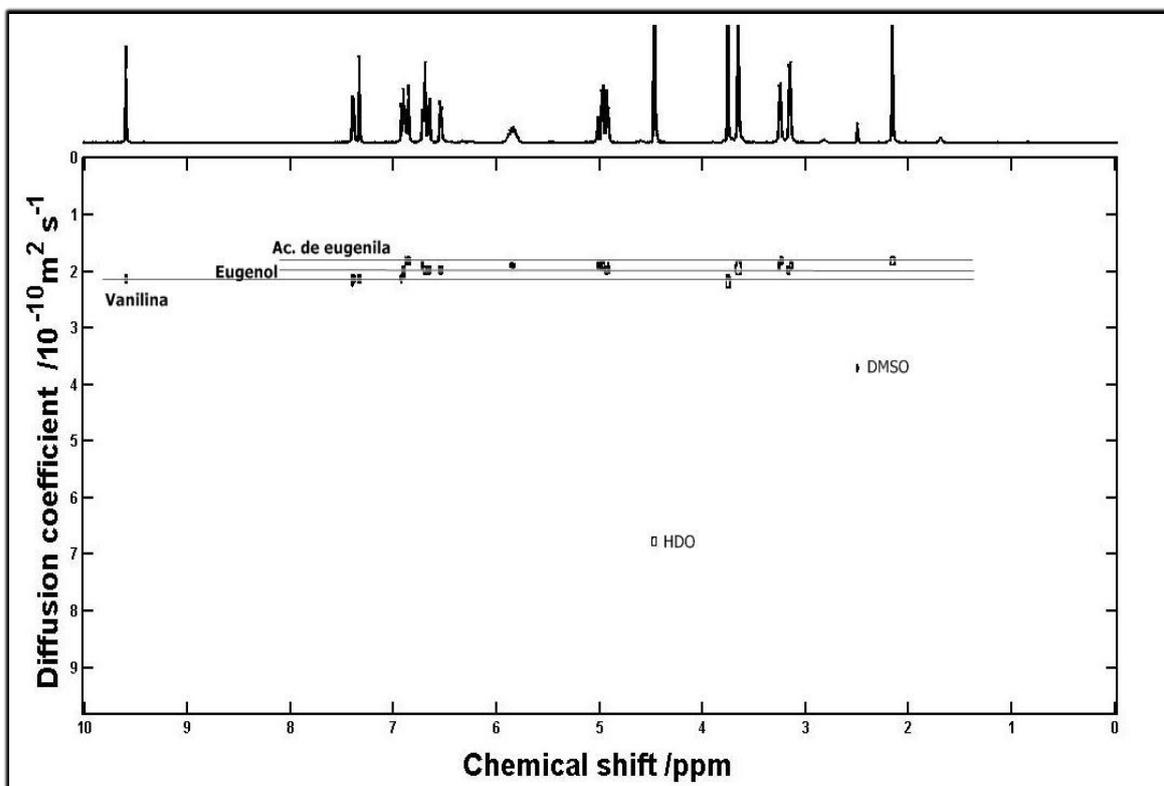
Brij 78	Coeficiente de Difusão				$(\Delta$ EVAc %)*		
	Eugenol	Vanilina	Ac. de eugenila	Brij 78			
	1	2	3	4	1-2	1-3	2-3
-	1,91027±0,00337	2,11853±0,00925	1,82629±0,00450	-	9,83	4,39	13,79
40mM	1,04144±0,00413	1,56921±0,02159	0,79497±0,01166	0,09923±0,00323	33,63	23,66	49,33

\*variação percentual

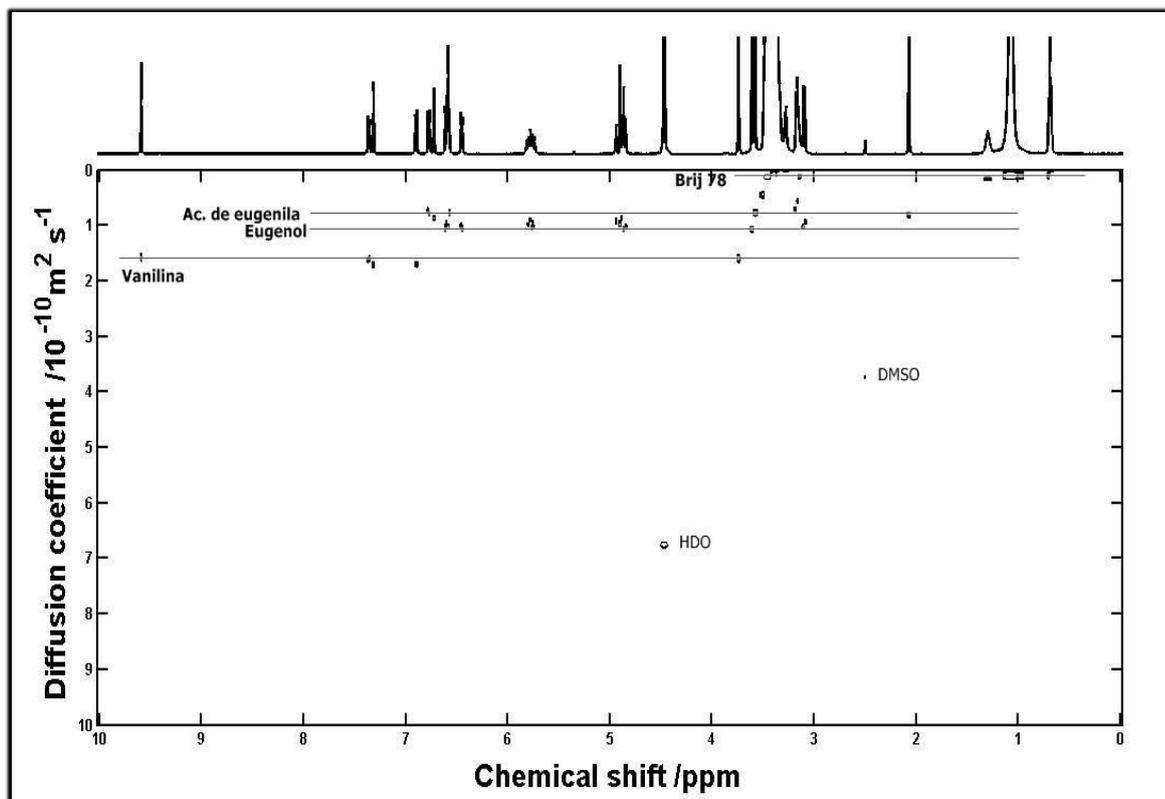
**Figura 99:** Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1 para o eugenol, vanilina e acetato de eugenila 1,0 mg cada com e sem adição de Brij 78 40 mM



**Figura 100:** Espectro de RMN DOSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) com 1,0 mg de cada componente de EVAc



**Figura 101:** Espectro de RMN DOSY (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) com 1,0mg de cada componente EVAc e 40mM de Brij 78



### 10.2.3 Eugenol, *cis* e *trans* - isoeugenol (ECT)

Os compostos *cis* e *trans*-isoeugenol (Figura 79, pág 118) foram obtidos por uma reação de isomerização do eugenol. Com o objetivo de separar os compostos por DOSY, utilizou-se 1,0 mg da mistura do *cis* e *trans*-isoeugenol adicionada de 1,0 mg de eugenol, mistura denominada de ECT. O espectro DOSY (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) (Figura 103, pág 150) da mistura de isômeros, revelou valores próximos de coeficiente de difusão para os 3 compostos, logo o experimento padrão de DOSY não foi suficiente para promover a separação dos sinais destes. A variação percentual ( $\Delta ECT$ ) dos valores de coeficiente de difusão dos compostos é mostrada na Tabela 35 (pág 149).

Adicionou-se a mistura 40 mM da matriz Brij 78. O espectro DOSY (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) (Figuras 104 e 105, páginas 150 e 151) dos isômeros adicionado da matriz, revelou uma pequena resolução dos sinais dos componentes e conseqüentemente uma maior variação percentual ( $\Delta ECT$ ) dos valores de coeficiente de difusão, podendo identificá-los na mistura (Tabela 35). Para obter uma melhor resolução, optou-se por também realizar o experimento com uma concentração maior de Brij 78. Para isso foram utilizados 80 mM de

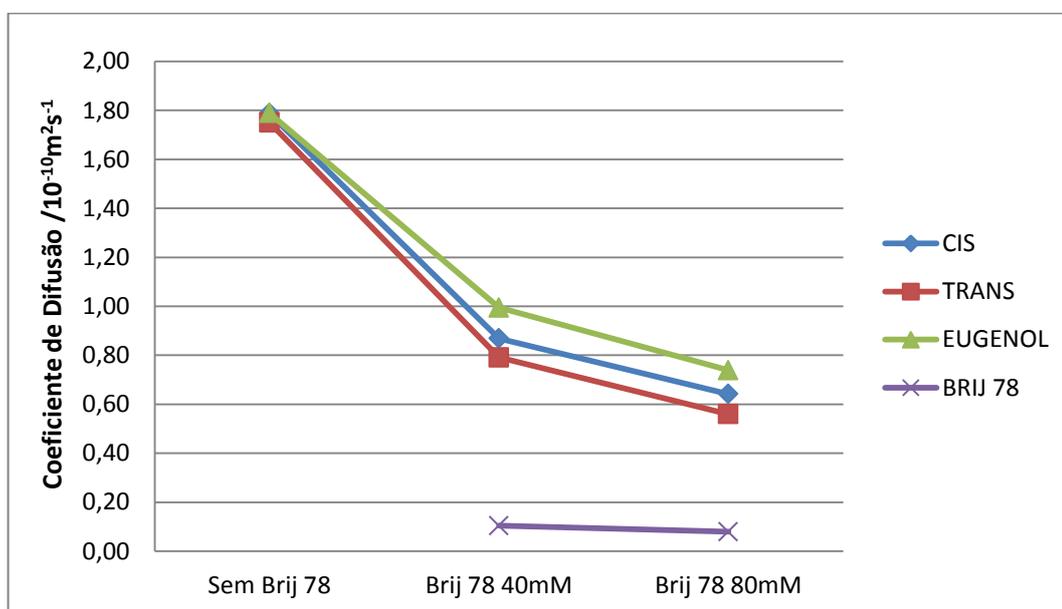
Brij 78 com 1mg de eugenol e 1 mg da mistura de *cis* e *trans*-isoeugenol. O espectro DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) da mistura de isômeros adicionado de 80mM de Brij 78 (Figuras 105 e 106, pág 151), revelou uma melhora na resolução dos sinais e conseqüentemente uma maior variação percentual ( $\Delta$ ECT) nos valores de coeficiente de difusão dos compostos (Tabela 35). A Figura 102 representa o gráfico dos valores de coeficiente de difusão variando a concentração de Brij 78.

**Tabela 35:** Coeficientes de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1 para o eugenol, *cis* e *trans*- isoeugenol e Brij 78 40mM e 80 mM

Brij 78	Coeficientes de Difusão				$(\Delta$ ECT %)*		
	<i>Cis</i> -Isoeugenol	<i>Trans</i> -Isoeugenol	Eugenol	Brij 78	1-2	1-3	2-3
	1	2	3	4			
-	1,78793 $\pm$ 0,02512	1,75064 $\pm$ 0,01006	1,78889 $\pm$ 0,00832	-	2,08	0,05	2,13
40mM	0,86854 $\pm$ 0,00810	0,79068 $\pm$ 0,00346	0,99466 $\pm$ 0,00562	0,10364 $\pm$ 0,00479	8,96	12,7	20,50
80mM	0,64168 $\pm$ 0,00558	0,55931 $\pm$ 0,00217	0,73889 $\pm$ 0,00662	0,07890 $\pm$ 0,00390	12,8	13,2	24,30

\*variação percentual

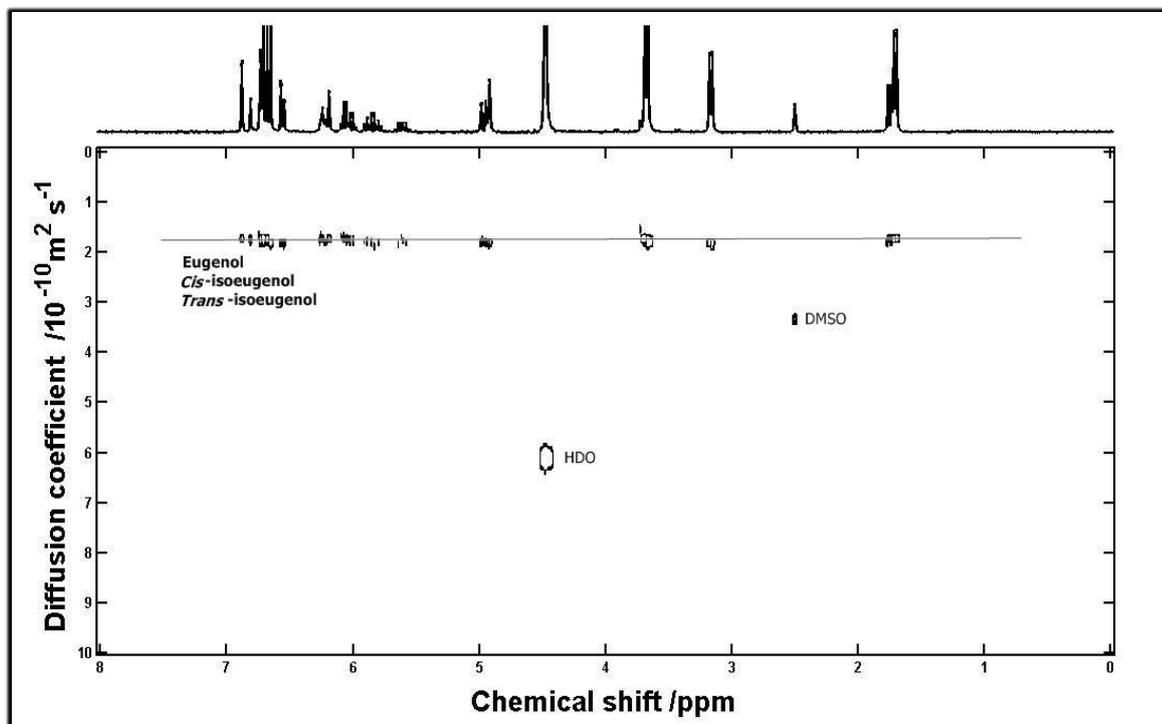
**Figura 102:** Valores do coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1 do eugenol, *cis*-isoeugenol, *trans*-isoeugenol e Brij 78 variando a concentração de Brij 78



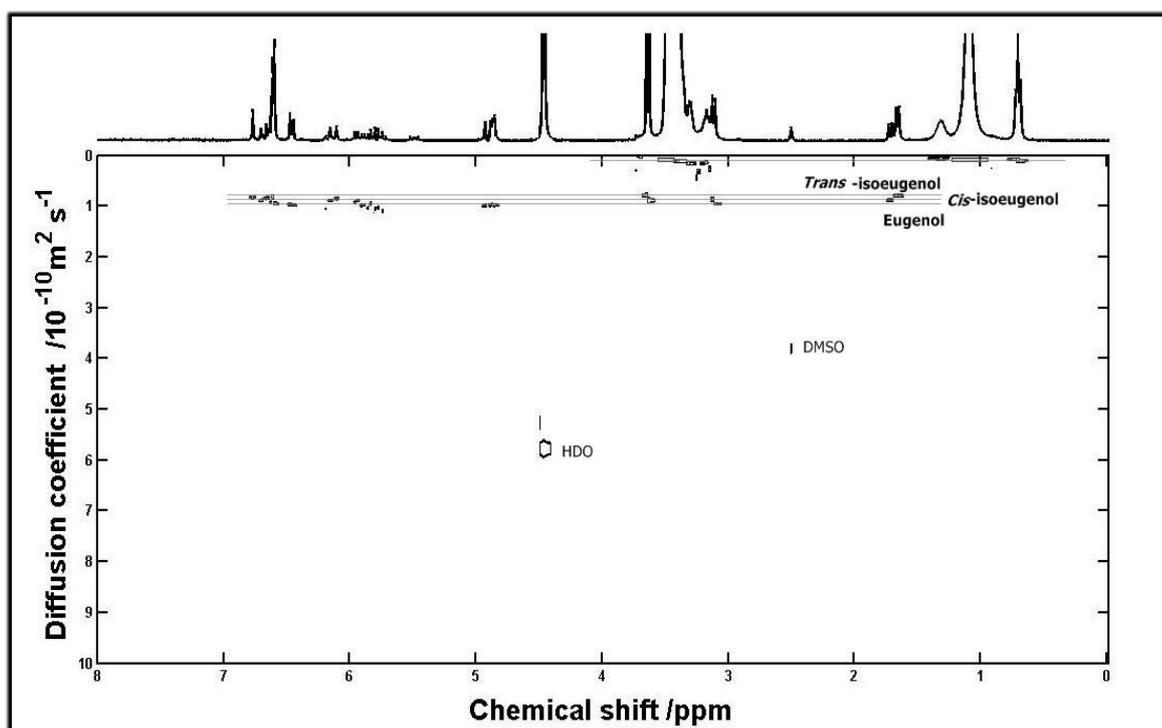
O surfactante Brij 78 se mostrou uma matriz eficaz na separação de componentes fenólicos, promovendo uma interação com os mesmo e modificando os valores de coeficiente

de difusão, tornando possível o assinalamento dos sinais e identificação dos compostos presentes na mistura.

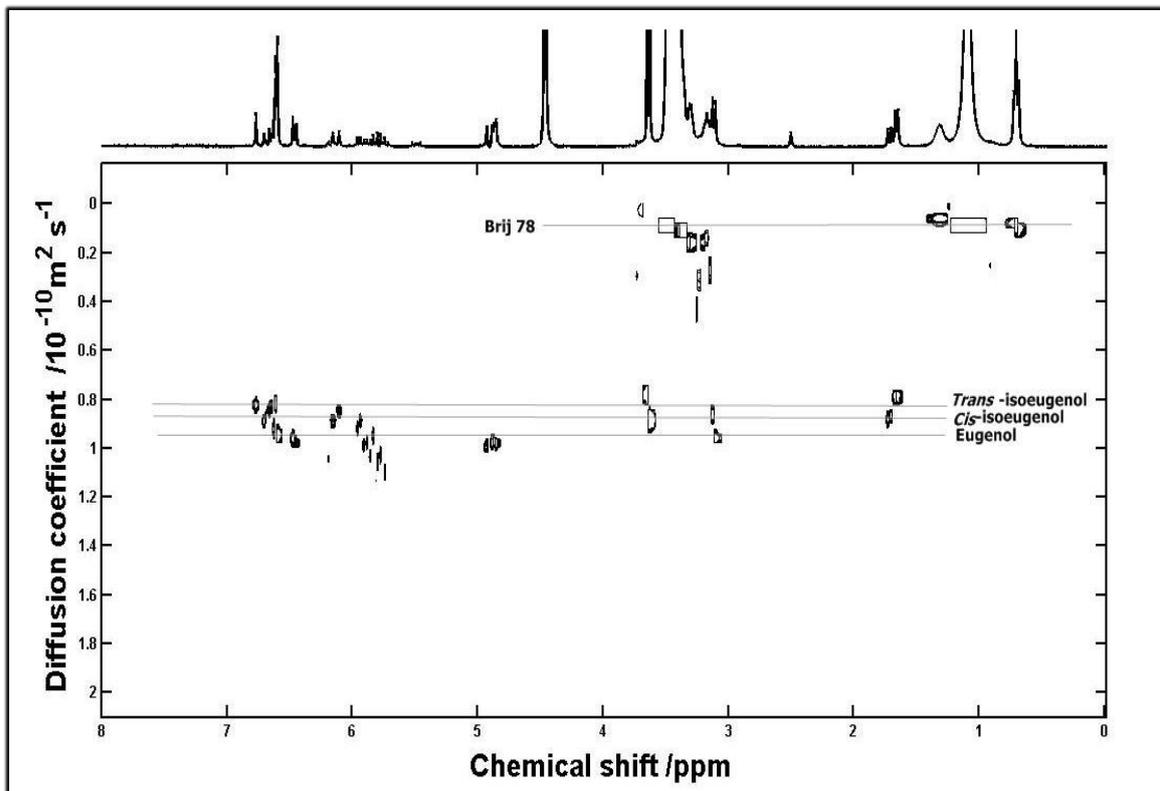
**Figura 103:** Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, *cis* e *trans* - isoeugenol



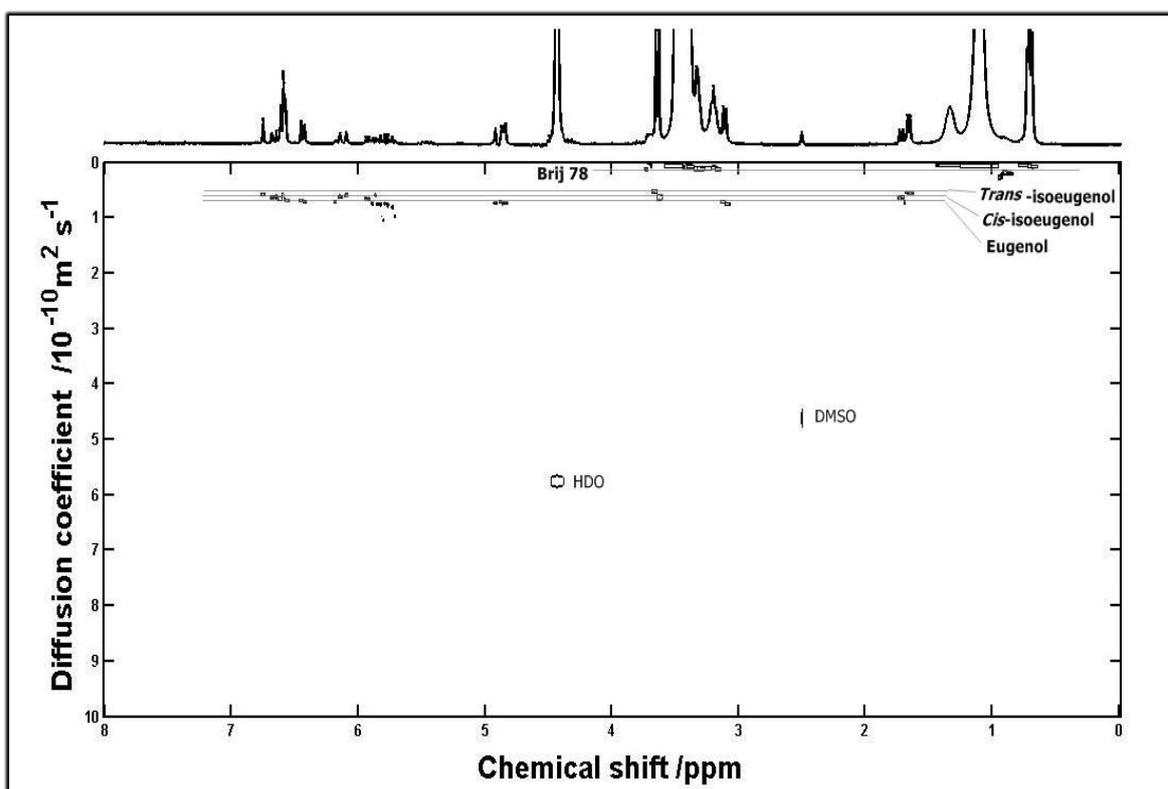
**Figura 104:** Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1) do eugenol, *cis* e *trans* - isoeugenol e Brij 78 40mM



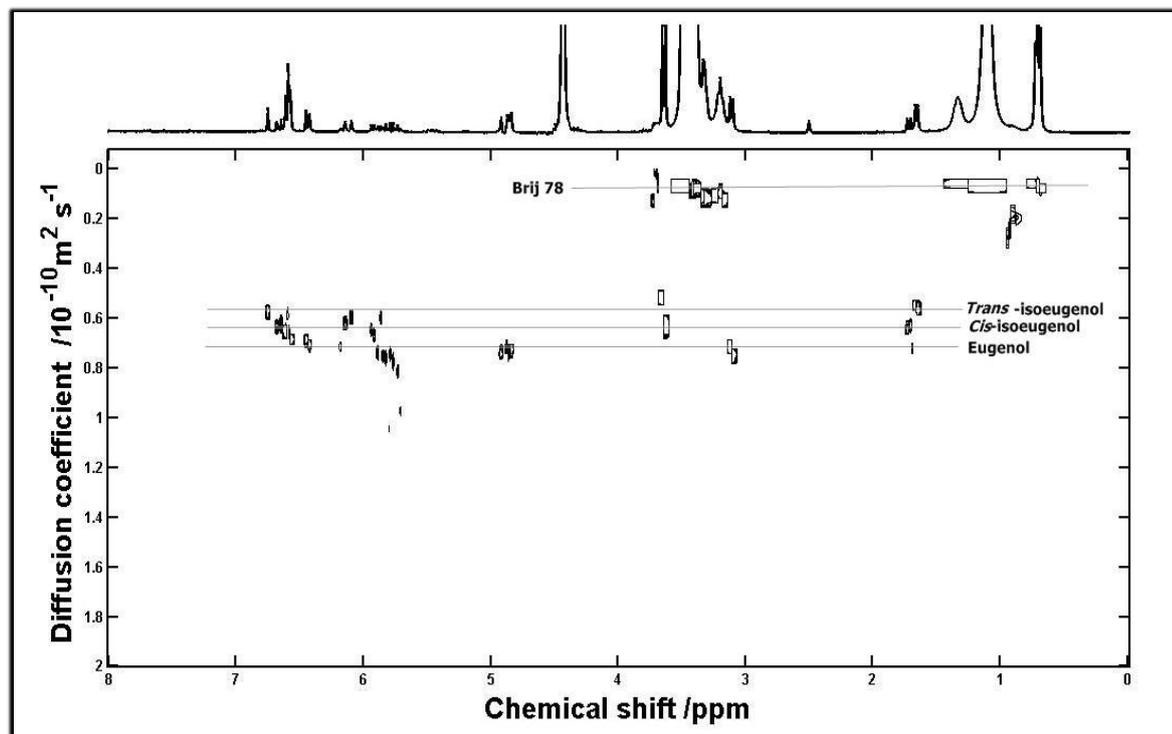
**Figura 105:** Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) do eugenol, *cis* e *trans* - isoeugenol e Brij 78 40mM (Expansão)



**Figura 106:** Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) do eugenol, *cis* e *trans* - isoeugenol e Brij 78 80mM



**Figura 107:** Espectro de RMN DOSY (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 1:1) do eugenol, *cis* e *trans* – isoeugenol e Brij 78 80mM (Expansão)



## 11.0 CONCLUSÕES

Na primeira parte deste trabalho, realizou-se o estudo fitoquímico dos talos de *Croton velutinus* que conduziu ao isolamento e caracterização de cinco metabólitos secundários. A partir do extrato hexânico foi isolado o flavonoide 5 - hidróxi-3, 6, 7, 4'-tetrametoxiflavona e do extrato etanólico foram isolados o flavonoide casticina e o sesquiterpeno delobanona, todos já conhecidos na literatura. O extrato etanólico ainda forneceu dois metabólitos secundários inéditos na literatura, o sesquiterpeno (6*S*, 7*S*) 7,11 - diidróxi-bisabol-2-en-4-ona e um diterpeno clerodano denominado ácido velutinóico.

Os extratos e frações de *C. velutinus* foram submetidos a testes de atividade anticolinesterásica, antioxidante, larvicida e angiotensina I. Somente as frações CVHT-H e CVHT-DCM-1, CVHT-Ac e CVHT-MeOH mostraram resultados superiores de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) aos do padrão Eserina. Todas as amostras apresentaram potencial de atividade antioxidante, embora apenas as frações CVHT-Ac e CVET--H tenham apresentado atividade superior ao padrão BHT. As amostras utilizadas no teste larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, não apresentaram letalidade, contudo foi observada a formação do estado letárgico, estado em que as larvas apresentam movimentação limitada. O extrato etanólico CVET assim como o flavonoide casticina, isolado deste, não apresentaram atividade significativa de inibição da enzima conversora da angiotensina I.

Na segunda parte deste trabalho foi demonstrada uma metodologia para análise de RMN dos compostos majoritários por DOSY, eugenol e  $\beta$ -cariofileno, do óleo essencial da alfavaca roxa (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*), utilizando diferentes solventes. Foram obtidos os derivados do eugenol, acetato de eugenila, *cis* e *trans*-isoeugenol e adição de vanilina, para análises por MAD, utilizando o surfactante não iônico Brij 78 em uma mistura de solventes. Os resultados revelam que a aplicabilidade do MAD utilizando Brij 78 em produtos naturais, mostrou eficiência na separação de compostos com estruturas semelhantes e até de isômeros.

Os óleos essenciais óbitos da alfavaca roxa e do cravo-da-índia assim como o eugenol e acetato de eugenila, foram submetidos à atividade larvicida. Todos se mostraram eficientes, sendo o óleo essencial do cravo-da-índia que após 24 horas, apresentou maior valor de DL<sub>50</sub> 99,92 mg/L.

## 12.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

ADAMS, R. W.; AGUILAR, J. A.; CASSANI, J.; MORRIS, G. A; NILSSON, M. Resolving natural product epimer spectra by matrix-assisted DOSY. **Org. Biomol. Chem.** v. 9, p. 7062-7064, 2011.

AFFONSO, R. S. *et al.* Quantificação e caracterização dos principais componentes do extrato etanólico de cravo-da-índia *Syzygium aromaticum* [L] Merr. Et perry. **Rev. Virtual. Quim.** P. 1316-1331, 2014.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam Netherlands, 1989, 564p.

ÁLVAREZ, J. M. *et al.* Flavonoid glycosides from *Persea caerulea*. Unraveling their interactions with SDS-micelles through matrix-assisted DOSY, PGSE, mass spectrometry, and NOESY. **Magn. Reson. Chem.** 2016.

ASARO, F.; SAVKO, N. Resolution of a nonionic surfactant oligomeric mixture by means of DOSY with inverse micelle assistance. **Magn. Reson. Chem.** v. 49, p. 195-198, 2011.

BARRERO, A. F. *et al.*, Stereochemistry of 14-hydroxy- $\beta$ -caryophyllene and related compounds. **Tetrahedron.** v. 51, n. 13, p. 3813-3822, 1995.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P., *et al.* Cicatrização de feridas: Estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 33, n. 2, mar/abril, 2006.

BJORNERAS, J. *et al.* Resolving complex mixtures: trilinear diffusion data. **J Biomol NMR.** v. 58. p. 251-257. 2014.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **LWT-Food Sci. Technol.** v. 28, n. 25, 1995.

BROWN, G. D; LIANG, G. Y; SY, L. K. Terpenoids from seeds of *Artemisia annua*. **Phytochemistry.** v. 64, p. 303-323, 2003.

CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. **Phys. Rev.** v.94, p. 630, 1954.

CARRASCO, A. H. *et al.* Eugenol and synthetic analogues inhibit cell growth of human câncer cells (Part I). **J. Braz. Chem. Soc.** v. 19, n. 3, 543-548, 2008.

CASSANI, J.; NILSSON, M.; MORRIS, G. A. Flavonoid mixture analysis by matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 131-134, 2012.

CASTRO, H. G., *et al.* Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. **Rev. Ciênc. Agron.** v. 41, n. 2, p 308-314, abr-jun, 2010..

CAVALCANTI, E. S. B., MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti*. L. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.99,p. 541- 544, 2004.

CHAUDHARI, S. R.; SRINIVASA.; SURYAPRAKASH, N. Cyclodextrin and its complexation for resolution of isomers using diffusion ordered spectroscopy. **Journal of molecular Structure.** v. 1033, p. 75-78, 2013.

CHAUDHARI, S. R.; SURYAPRAKASH, N. Diffusion ordered spectroscopy for resolution of double bonded *cis, trans*-isomers. **Journal of Molecular Structure**, v. 1017, p. 106-108, 2012.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry.** Elsevier. 2<sup>a</sup> ed. v.27, 399p, 2009.

CORDEIRO, I. Euphorbiaceae. In: Stannard, B.L. (ed.). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Kew, Royal Botanic Gardens.** p. 300-317. 1995.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DEGÁSPARI, C. G.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. 5<sup>a</sup> ed., **Wiley:** Curitiba, 2004.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais Arte e Ciência:** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1996.

EHLERT, P. A *et al.* Variação química de seis genótipos de manjeriço no estado de Sergipe. **46º Congresso Brasileiro de Oleicultura: Diversificação e industrialização na horticultura**, Goiás. 2006.

ELLMAN. G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. JR.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v.95, 1961.

EVANS, R.; DAY, I. J. Matrix-Assisted Diffusion-Ordered Spectroscopy. **J. name.** p. 1-3, 2013.

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 4, n.18, p. 627-641. 2008.

GOBBO-NETO L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova.** v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, A. G. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 1, n.74, p. 145-150. 2002.

GOMES, C. L. **Estudo químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae).** Dissertação de Mestrado. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará, 100p, 2010.

GOSTAN, T. *et al.*, Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY. **Magn. Reson. Chem.** v.24, p. 246-249, 2004.

GRAIKOU, K. *et al.*, Chemical constituents from *Croton insularis*. **Helvetica Chimica Acta.** v. 88, 2005.

GRAMOSA, N. V. **Estudo químico-farmacológico de *Copaifera langsdorffii* Desf (Leguminosae).** Tese de Doutorado, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 225p, 2001.

GULÇIN, I.; OKTAY, M.; KIREÇCI, E.; KUFREVIOLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum*. L) seed extracts. **Food Chemistry.** v. 83, p. 371-382, 2003.

HÄDENER, M.; GJUROSK, I.; FURRER, J.; VERMATHEN, M. Interactions of polyvinylpyrrolidone with Chlorin e6-based photosensitizers studied by NMR and electronic absorption spectroscopy. **J. phys. Chem.** v. 119, p. 12117-12128, 2015.

HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, p. 580-594, 1950.

HEISEL, K. A.; GOTO, J. J.; KRISHNAN, V. V. NMR Chromatography: Molecular diffusion in the presence of pulsed field gradients in analytical chemistry applications. **American Journal of Analytical Chemistry.** v. 3, p. 401-409, 2012.

HODGE, P.; MONVISADE, P.; MORRIS, G. A.; PREECE, I.A novel method for screening soluble compound libraries. **Chem. Commun.** p. 239-240, 2001.

HUANG, S.; GAO, J.; WU, R.; LI, S.; BAI, Z. Polydimethylsiloxane: A general matrix for high-performance chromatographic NMR spectroscopy. **Angew. Chem.** v. 126, p. 11776-11779, 2014.

JOHNSON Jr, C. S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. **Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.** v.34,p.203-256, 1999.

JÚNIOR, S. F. P. *et al.*, Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 16, p. 397-402, 2006.

JÚNIOR, S. F. P; CONSERVA, L. M; SILVEIRA, E. R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 16, n. 6B, p. 1420-1424, 2005.

KAPOOR, Y.; HOWEL, B. A.; CHAUHAN, A. Liposome assay for evaluating ocular toxicity of surfactants. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 50, p. 2727-2735, 2009.

KAVAKKA, J. S.; KILPELÄINEN, I.; HEIKKINEN, S. General Chromatographic NMR method in liquid state for synthetic chemistry: Polyvinylpyrrolidone assisted DOSY experiments. **Org. Lett.** v. 11, n. 6, p. 1349-1352, 2009.

KAVAKKA, J. S. *et al.*, Enhanced chromatographic NMR with polyethyleneglycol. A novel resolving agent for diffusion ordered spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.** v. 48, p. 777-781, 2010.

LABRA, M *et al.* Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v.167, p. 725-731. 2004.

LI, C.; DU, H.; WANG, L.; SHU, Q.; ZHENG, Y.; XU, J.; YANG, R.; GE, Y.; Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* Section Moutan) yellow flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 8496-8503, 2009.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na cadeia do espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**. v. 2, n. 21, p. 299-344. 2003.

LIMA, L. R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s). **Biota Neotrop**. v. 2, n. 8, p. 177-231. 2008.

LUU, T. X. T.; LAM, T. T.; LE, T. N.; DUUS, F. Fast and green microwave-assisted conversion of essential oils allylbenzenes into the corresponding aldehydes via alkene isomerization and subsequent potassium permanganate promoted oxidative alkene group cleavage. **Molecules**. v.14, 3411-3424, 2009.

MLADENOVA, K. E.; TSANKOVA, E.; KOSTOVA.; IVANOVA, B. S. Indicumenone, a new bisabolane ketodiol from *Chrysanthemum indicum*. **Plant med**. v. 53, p. 118-119, 1987.

MORRIS, K. F.; JOHNSON Jr, C. S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc**. v. 114, p. 3139-3141, 1992.

MORRIS, K. F.; STILBS, P.; JOHNSON Jr, C. S. Analysis of mixtures based on molecular size and hydrophobicity by means of diffusion-ordered 2D NMR. **Anal. Chem**. v. 66, p. 211-215, 1994.

NILSSON, M. The DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data. **J. Magn. Reson.**, v. 200, p. 296-302, 2009.

NOVOA-CARBALLAL, R. *et al.* NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures. **Nat. Prod. Rep**, v. 28, n. 78, 2011.

OLIVEIRA, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**. v. 9, n. 4. 2013.

OLIVEIRA, R. A, *et al.*, Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Braz. J. Pharmacogn**. v. 19, n. 3, p. 771-775, Jul/Set. 2009.

PAULA, V. F.; CRUZ, M. P.; Constituintes Químicos de *Bombacopsis glabra* (Bombacaceae). **Quim. Nova**. v. 29, n. 2, p. 213-125, 2006.

PELTA, M. D.; MORRIS, G. A.; STCHEDROFF, M. J.; HAMMOND, S. J. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.** v. 40, p. S147-S152, 2002.

PINTO, A. C; ALENCASTRO, R. B; SANTOS, N. P; MORAIS, S. M (org.); FILHO, R. B (org.). **Produtos Naturais: Estudos Químicos e Biológicos**. Fortaleza: EdUECE, 2007. 240p.

RHEE, I.K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v.915, p.217-23, 2001.

RIBEIRO, M. E. N. P. *et al.*, Solubilisation capacity of Brij surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 436, p. 631-635, 2012.

RODRIGUES, A. S. **As tribos Dalechampiae Müll. Arg. E Manihoteae Melchior (Euphorbiaceae) no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2007.

RODRIGUES, E. D. **Estratégias de aumento de eficiência de análise de produtos naturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear**. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP. Ribeirão Preto-SP. 2010. 208p.

ROGERSON, A. K. **New Techniques in Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy**. Tese de doutorado. University of Manchester. 183p, 2013.

ROGERSON, A. K.; AGUILAR, J. A.; NILSSON, M.; MORRIS, G. A. Simultaneous enhancement of chemical shift dispersion and diffusion resolution in mixture analysis by diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Chem. Commun.** v. 47, p. 7063-7064, 2011.

SAITO, T, *et al.*, **Integrated spectral database system for organic compounds**. Disponível em: [http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/cre_index.cgi). Acesso em: 22 de julho de 2015.

SALATINO, A; SALATINO, F; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALINAS, S. R. A. Einstein e a teoria do movimento browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 27, n. 2, p. 263-269, 2005.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 1, n. 22, p. 99-118. 2008.

SECCO, R. S. *et al.* An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l in Brazil. **Rodriguésia.** v. 1, n. 63, p. 227-242, 2012.

SEEDHOUSE, S. J. NMR Diffusion and Relaxation Studies on Surfactants Systems. Chemistry Honor Teses, Department of Chemistry. **State University of New York**, 2008.

SILVA, J. S. *et al.* Sinopse das espécies de Croton L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta. bot. bras.** v. 2, n. 24, p. 441-453. 2010.

SIMENOVA, M.; RANGEL, M.; IVANOVA, G. NMR study of the supramolecular structure of dual drug-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 15, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** 5 ed., Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SMITH, O.; HÖGBERG, H. E. Synthesis of a prenylbisabolane diterpene, a natural insecticide from *Croton linearis*, and of the bisabolane sesquiterpenes (-)-delobanone and (-)-*epi*-delobanone. **Tetrahedron.** v. 58, p. 7691-7700, 2002.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the Field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUZA, A. A. *et al.* **Fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear: Difusão molecular por RMN.** AUREMN. n. 4, 2009. 59p.

SOWMIYA, M.; TIWARI, A. K.; SAHA, S. K. Fluorescent probe studies of micropolarity, premicellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants. **J. Colloid Interface Sci.** v. 344, p. 97-104, 2010.

SPOHR, T. C. L. S. *et al.*, Effects of the flavonoid casticin from brasilian Croton betulaster in cerebral cortical progenitors in vitro. Direct and indirect action through astrocytes. **Journal of Neuroscience Research.** v. 88, p. 530-541, 2010.

STEJSKAL, E. D.; TANNER, J. E. **J. Chem. Phys.** v. 42, p. 288, 1965.

TABER, D. F.; BUI, G.; CHEN, B. Synthesis of (-)-Delobanone. **J. Org. Chem.** v. 66, p. 3423-3426, 2001.

TAKEDA, K.; SAKURAWI, K.; ISHII, H. Sesquiterpenes of Lauraceae plants-III Structure and absolute configuration of delobanone and acetoxidelobanone from *Lindera triloba*. **Tetrahedron.** v. 27, p. 6049-6055, 1971.

TANFORD, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. **Wiley**, New York, 1980.

TORMENA, C. F. *et al.*, Matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy: mixture resolution by NMR using SDS micelles, **Magn. Reson. Chem.** v. 48, p. 550-553. 2010.

TORMENA, C. F. *et al.*, Matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy: application of surfactant solutions to the resolution of isomer spectra. **Magn. Reson. Chem.** v. 50, p. 458-465. 2012.

TORRES, D. S. C. **Diversidade de *Croton* L. (EUPHORBIACEAE) no Bioma da Caatinga.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim. Nova.** v. 26, No.3, 301-304, 2003.

TRIFUNOVIC, S. *et al.*, Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. **Phytochemistry.** v. 67, p. 887-893, 2006.

VIEIRA, M. G. S. **Estudo químico de duas espécies de *Xylopia* (Annonaceae) e Resolução de misturas de produtos naturais por Espectroscopia Ordenada por Difusão Assistida por Matriz (MAD).** Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE. 2014.

VIEIRA, M. G. S. *et al.*, Natural product mixture analysis by matrix-assisted DOSY using Brij surfactants in mixed solvents. **RSC Adv.** v. 4, p. 42029-42-034. 2014.

VIEIRA, P. R. N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis*.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE. 2009.

VIZZOTTO, L. **Estudo e aplicações das técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas da ordem rutales**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 2004.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. n.81, p. 33-44. 1994.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Nat. Prod. Rep.** v. 28, n. 48, 2011.

WU, D.; CHEN, A.; JOHNSON, C. S. Heteronuclear-Detected Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy through Coherence Transfer. **J.Magn.Reson.Series A**. v.123, p. 215-218, 1996.