



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDERSON CORRÊA PAULA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Cnidoscolus phyllacanthus

FORTALEZA

2014

ANDERSON CORRÊA PAULA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Cnidoscolus phyllacanthus

Dissertação submetida ao Programa 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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Telma Leda Gomes de Lemos

FORTALEZA

2014

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)

- P346c Paula, Anderson Corrêa.
Constituintes Químicos e Atividades Biológicas de *Cnidoscopus phyllacanthus* / Anderson Corrêa Paula.
– 2014.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
1. Euphorbiaceae. 2. *Cnidoscopus phyllacanthus*. 3. Atividade Citotóxica. 4. Triterpeno. 5. Bis-norditerpeno. I. Título.

CDD 572

ANDERSON CORRÊA PAULA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Cnidoscolus
phyllacanthus*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Química..

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 07/11/2014

EXAMINADORES:

Profa. Dra, Telma Ieda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Leonardo Alcântara Alves
Instituto Federal do Rio Grande do Norte - Campus Apodi – IFRN

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças, paciência, sabedoria e, além disso, colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, permitindo que esse trabalho pudesse ser possível.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, me incentivaram e se orgulharam de todos os caminhos que segui.

A minha Orientadora, Profa. Dra Telma Leda Gomes de Lemos que com dedicação e profissionalismo me ofereceu apoio para realização deste trabalho e por ter permitido trabalhar no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais (LBPN).

A todos os meus colegas de curso que estiveram comigo nos mais diversos momentos da caminhada acadêmica.

Aos meus amigos de laboratório (LBPN) Juliana, André, Gisele, Cleane, Thalissa, Luciana Gregório, Patrícia, Felipe, Daniele, Luciana Bertini, Leonardo Alcântara, Ayla Bizerra, Leonardo Carvalho, Karina, Davi Coelho, Allyson Araújo e todos os amigos do LABS, que me proporcionaram ensinamentos e alegrias durante toda minha caminhada acadêmica.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massa e Infravermelho, pela contribuição e comprometimento com a realização dos experimentos.

A todos os professores do curso de Pós Graduação em Química que colaboraram muito para a minha formação moral e intelectual ao longo destes anos de convívio.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e a CAPES e FUNCAP, pelo suporte financeiro ao curso de Pós-Graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

RESUMO

Cnidoscolus phyllacanthus (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como “favela”, é uma planta encontrada na caatinga. É utilizada como alimentos para animais, entretanto pode causar intoxicação após a ingestão da planta fresca. Este trabalho descreve o estudo fitoquímico da espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*, visando o isolamento e identificação de substâncias com atividade citotóxica e antioxidante. O estudo fitoquímico realizado com o extrato hexânico e etanólico da casca do caule da espécie levou ao isolamento e a caracterização de quatro constituintes e duas misturas: A mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol, o triterpeno lupeol, o éster de triterpeno nonanoato de lupeol, uma mistura de triterpenos, identificadas como cinamato de lupeol com diidrocinamato de lupeol, além de dois compostos tricíclico benzociclo-hepteno, os bis-nor-diterpenos deoxofavelina e favelina metil éter. A determinação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de técnicas espectroscópicas como: infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo as técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e comparação com dados registrados na literatura. Analisou-se ainda o óleo fixo da casca do caule e sua atividade antioxidante, usando o método do sequestro de radicais, que foi realizada com os extratos e frações observando-se pequena ou nenhuma atividade. Os compostos foram testados ainda quanto à sua atividade citotóxica sobre as linhagens celulares HL60 (leucemia promielocítica humana), NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano). Deoxofavelina foi o composto mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de CI_{50} variando de 2,7 a 8,9 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: Euphorbiaceae. *Cnidoscolus phyllacanthus*. Atividade Citotóxica. Triterpeno. Bis-nor-diterpeno.

ABSTRACT

Cnidoscolus phyllacanthus (Euphorbiaceae), popularly known as favela, is usually a common thorny plant in the savanna. It is used as food for animals and can cause poisoning after eating the fresh plant. This paper describes the phytochemical study species belonging to the family Euphorbiaceae, seeking the isolation and structural elucidation of organic compounds. Chemical studies conducted with the hexane and ethanolic extract from the stem bark of the species allowed the isolation and characterization of four components: the mixture of steroid sitosterol and stigmasterol, the triterpene Lupeol, ester triterpene lupeol nonanoate, a mixture of triterpenes which were identified as lupeol cinnamate with lupeol dihydrocinnamate and two benzocycloheptene tricyclic compounds, the bis-nor-diterpenes deoxofaveline and methyl-éterfaveline. The structural assignment of the compounds was performed by spectroscopic techniques such as infrared (IR), mass spectrometry (MS) and hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and carbon -13 (^{13}C - NMR) techniques including two dimensional (COSY, HSQC and HMBC) and comparison with data reported in the literature. It also analyzes the compositions of fixed oil from the stem bark. Extracts and fractions were tested for scavenging radical using DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) method and showed weak or no activity. The compounds were tested for their cytotoxic activity against the cell lines HL60 (human pro-myelocytic leukemia), NCI-H292 (human lung carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma). Dexofaveline compound was the most active among all, with IC_{50} values ranging from 2.7 to 8.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Keywords: Euphorbiaceae. *Cnidoscolus phyllacanthus*. Cytotoxic activity. Triterpeno. Bis-nor-diterpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia de um espécime <i>Cnidoscopus phyllacanthus</i>	20
Figura 3 - Estrutura de CCF-1	30
Figura 4 - Espectro na região do infravermelho de CCF-1	32
Figura 5 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-1	32
Figura 6 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-1	33
Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-1	33
Figura 8 - Subestrutura 1 de CCF-2	35
Figura 9 - Subestrutura 2 de CCF-2	35
Figura 10 - Estrutura de CCF-2	35
Figura 11 - Espectro na região do infravermelho de CCF-2	37
Figura 12 - Espectro de massas (EM-ESI (+) de CCF-2	37
Figura 13 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-2	38
Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-2	38
Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-2	39
Figura 16 - Espectro de RMN ^1H , $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY [500 MHz, CDCl_3] de CCF-2	39
Figura 17 - Espectro de RMN ^1H , $^{13}\text{C} - \text{HMBC}$ [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-2	40
Figura 18 - Subestrutura de CCF-3 A.....	41
Figura 19 - Subestrutura de CCF-3 B.....	41
Figura 20 - Subestruturas de CCF-3 A e CCF-3 B.....	42
Figura 21 - Estrutura de CCF-3 A e CCF-3 B.....	42
Figura 22 - Espectro na região do infravermelho de CCF-3	44
Figura 23 - Espectro de massas (EM-ESI (+) de CCF-3	44
Figura 24 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-3	45
Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-3	45
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-3	46
Figura 27 - Espectro de RMN ^1H , $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY [500 MHz, CDCl_3] de CCF-3	46
Figura 28 - Espectro de RMN ^1H , $^{13}\text{C} - \text{HSQC}$ [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3	47
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN ^1H , $^{13}\text{C} - \text{HSQC}$ [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3	47
Figura 30 - Espectro de RMN ^1H , $^{13}\text{C} - \text{HMBC}$ [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3.....	48

Figura 31 - Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 e 125MHz, CDCl_3] de CCF-3	48
Figura 32 - Estrutura de CCF-4 A e CCF-4 B	49
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-4	50
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-4	50
Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-4	51
Figura 36 - Estrutura 1 de CCF-5	52
Figura 37 - Estrutura 2 de CCF-5	53
Figura 38 - Estrutura de CCF-5	53
Figura 39 - Espectro na região do infravermelho de CCF-5	54
Figura 40 - Espectro de massa (EM-ESI (+)) de CCF-5	55
Figura 41 - Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CCF-5	55
Figura 42 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] de CCF-5	56
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [75 MHz, CDCl_3] de CCF-5	56
Figura 44 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – 1H COSY [300 MHz, CDCl_3] de CCF-5	57
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-5	57
Figura 46 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-5	58
Figura 47 - Estrutura de CCF-6	59
Figura 48 - Estrutura de CCF-6	60
Figura 49 - Rota Biogenética para a formação de derivados do tricíclico benzociclohepteno	60
Figura 50 - Espectro na região do infravermelho de CCF-6	62
Figura 51 - Espectro de massa (EM-ESI (+)) de CCF-6	62
Figura 52 - Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CCF-6	63
Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] de CCF-6	63
Figura 54 - Espectro invertido de RMN ^{13}C -DEPT 135° [75 MHz, CDCl_3] de CCF-6	64
Figura 55 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – 1H COSY [300 MHz, CDCl_3] de CCF-6	64
Figura 56 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-6	65
Figura 57 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-6	65
Figura 58 - Estruturas do DPPH, Trolox e Vitamina-C	71
Figura 59 - Constituintes químicos isolados de <i>Cnidoscopus phyllacanthus</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura das substâncias de <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	23
Tabela 2 - Substâncias isoladas de <i>Cnidoscolus</i>	27
Tabela 3 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de CCF-1	31
Tabela 4 - Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-2, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.....	36
Tabela 5 - Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-3 A e CCF-3 B, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.....	43
Tabela 6 - Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-5, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.....	54
Tabela 7 - Dados espectrais comparativos de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-5 e CCF-6, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.....	61
Tabela 8 - Resultado do teste da atividade antioxidante	66
Tabela 9 - Concentração inibitória em 50% ($\text{CI}_{50\%}$) e intervalo de confiança (IC) das amostras em três linhagens tumorais.....	67
Tabela 10 - Composição química do óleo fixo de <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	68
Tabela 11 - Dados referentes aos extratos obtidos de <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	72
Tabela 12 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHCCF	74

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1 - Obtenção e caracterização dos ésteres metílicos da casca do caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* a partir de seu extrato hexânico.....73
- Fluxograma 2 - Fluxograma do isolamento da substância CCF-2, CCF-3 e CCF-4 obtida a partir do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus*..76
- Fluxograma 3 - Fluxograma do isolamento da substância CCF-5 e CCF-6, obtida a partir do extrato etanólico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus*.....77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α - Alfa

β - Beta

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CCF – Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus*

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

COSY – *Correlated spectroscopy*

DEPT - *Distortionless Enhancement by polarization Transfer*

EM - Espectrometria de Massa

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantun Coherence*

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

IV - Infravermelho

EHCCF - Extrato Hexânico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus*

EECCF - Extrato Etanólico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus*

EHCCFH - Extrato Hexânico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Hexano

EHCCFD - Extrato Hexânico da Casca do Caule da *C phyllacanthus* Fração
Diclorometano

EHCCFA - Extrato Hexânico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Acetato

EHCCFM - Extrato Hexânico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Metanol

EECCFH - Extrato Etanólico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Hexano

EECCFD - Extrato Etanólico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Diclorometano

EECCFA - Extrato Etanólico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Acetato de etila

EECCFM - Extrato Etanólico da Casca do Caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* Fração
Metanol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	18
2.1	Considerações sobre a família Euphorbiaceae	18
2.2	Considerações sobre o gênero <i>Cnidoscolus</i>	18
2.3	Considerações sobre a espécie <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	19
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	30
4.1.1	Determinação estrutural CCF-1	30
4.1.2	Determinação Estrutural CCF-2	34
4.1.3	Determinação Estrutural CCF-3	40
4.1.4	Determinação Estrutural CCF-4	49
4.1.5	Determinação Estrutural CCF-5	51
4.1.6	Determinação Estrutural CCF-6	58
4.2	Atividade antioxidante	66
4.3	Atividade citotóxica	67
4.4	Estudo dos ésteres metílicos.....	68
5	PARTE EXPERIMENTAL	69
5.1	Material vegetal e linhagens tumorais	69
5.2	Métodos Cromatográficos.....	69
5.2.1	Cromatografia em coluna (CC)	69
5.2.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	69
5.3	Métodos espectroscópicos	70
5.3.1	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	70
5.3.2	Espectrometria de Massas (EM)	70
5.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	70
5.4	Métodos físicos	71
5.4.1	Ponto de fusão	71
5.5	Atividade antioxidante: método de sequestro do radical DPPH.....	71
5.6	Identificação dos óleos fixos da casca do caule de <i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	72

5.6.1	<i>Obtenção dos extratos</i>	72
5.6.2	<i>Obtenção dos ácidos graxos livres da <i>Cnidocolus phyllacanthus</i></i>	72
5.6.3	<i>Obtenção dos ésteres metílicos da <i>Cnidocolus phyllacanthus</i></i>	72
5.7	<i>Obtenção dos metabólitos secundários de <i>Cnidocolus phyllacanthus</i></i>	74
5.7.1	<i>Fracionamento cromatográfico de EHCCF</i>	74
5.7.2	<i>Estudo cromatográfico dos insaponificáveis e isolamento da substância CCF-1</i>	74
5.7.3	<i>Fracionamento cromatográfico da fração EHCCFH e isolamento das substâncias CCF-2, CCF-3 e CCF-4</i>	75
5.7.4	<i>Fracionamento cromatográfico da fração EHCCFD e isolamento das substâncias CCF-5 e CCF-6</i>	76
5.8	Ensaio de citotoxicidade in vitro	78
6	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA	85

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes inesgotáveis de substâncias potencialmente ativas apresentando diferentes propriedades biológicas (HAMBURGUER; HOSTETTMANN, 1991). Uma das práticas mais antigas no tratamento e na cura das enfermidades é sem dúvida nenhuma, o uso dos produtos naturais, especialmente, os de origem vegetal. Nesse contexto, as plantas foram um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pela humanidade (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Levando em consideração a biodiversidade vegetal que existe no planeta (cerca de 250.000 espécies) e que somente cerca de 5 a 15% foi investigada do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico, as pesquisas com plantas superiores apresentam-se como uma fonte extremamente promissora para a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento de várias doenças (ROJAS *et al.*, 2003).

Cnidoscolus phyllacanthus (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como “favela ou faveleira”, é uma planta normalmente espinhosa comum na caatinga. A intoxicação espontânea por esta planta é relatada por fazendeiros quando animais têm acesso a plantas ou ramos recentemente cortados. Diferentes partes da planta moídas e secas, diluídas em água, são utilizadas por caçadores para matar pássaros. (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Seus espinhos causam dor intensa e feridas que cicatrizam com dificuldade. Suas folhas secas e cascas são usadas como forragem para os burros e porcos e as sementes, como ração para frango durante períodos de falta de chuva (LEMOS *et al.*, 1991).

A faveleira possui sementes que produzem óleo comestível e farinha, rica em minerais e proteínas. É uma das forrageiras de fundamental importância na região do semiárido por apresentar alta resistência às adversidades do ambiente e constituir importante fonte alimentar para a fauna, sendo utilizada como alternativa na suplementação alimentar para caprinos e ovinos (SOUZA; BATISTA; OLIVEIRA, 2012).

A faveleira se destaca no meio das outras plantas da caatinga pela sua extraordinária resistência à seca. Além da queda das folhas, diminuição da superfície foliar, proteção dos estômatos com pêlos contra o excesso de evaporação e abundância de súber, há, ainda, outro meio mais eficaz da faveleira conviver com a seca: é o armazenamento de reserva alimentícia, no caule e nas raízes, para a sua sobrevivência no período seco, permitindo o aparecimento de novas folhas, flores e frutos (CANDIDO, 2011).

Até o momento, as descrições botânicas inerentes à faveleira têm constatado a existência de uma única variedade, dotada de espinhos. No entanto, alguns estudos já relatam a existência de uma “mutante”, que é a faveleira sem espinho. A ocorrência dessa variedade foi registrada pela primeira vez no município de Independência, no Ceará (CANDIDO, 2011).

Estudos químicos realizados anteriormente com esta espécie relatam a presença de vários tipos de substâncias, destacando-se os terpenoides (LEMOS *et al.*, 1991) Tetracíclico propano, tricíclico benzocicloheptenos (LORENZI; MATOS, 2002, dentre eles um bis-nor-diterpeno, filacantona. 3- β -*O*-cinamoil-lupeol e 3- β -*O*-dihidrocinamoil-lupeol (LEMOS *et al.*, 1991).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde demonstram que anualmente surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes, tornando-se, em países desenvolvidos, a segunda causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares (SÍTIO, 2014). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2014), no Brasil, a estimativa para o ano de 2014 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer.

A partir do exposto, o presente trabalho relata uma reinvestigação desta espécie e o isolamento e a determinação estrutural dos metabólicos secundários do extrato hexânico e etanólico da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus*. Analisa ainda a obtenção dos óleos fixos da casca do caule e a capacidade antioxidante dos extratos da casca do caule da *Cnidocolus phyllacanthus* frente ao radical DPPH e verifica a citotoxicidade *in vitro* de substâncias puras em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

A prospecção química realizada com os extratos da casca do caule da espécie possibilitou o isolamento e a caracterização de quatro constituintes e duas misturas: a mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol, o triterpeno lupeol, o éster de triterpeno nonanoato de lupeol, uma mistura de triterpenos, as quais foram identificadas como cinamato de lupeol e diidrocinamato de lupeol e dois compostos tricíclico benzociclohepteno, os bis-nor-diterpenos deoxofavelina e favelina metil éter.

No isolamento das substâncias foram utilizados métodos cromatográficos tradicionais, como cromatografia gravitacional sobre gel de sílica.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância

magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo as técnicas bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC.

Este trabalho é apresentado em seis capítulos seguido das referências. Os capítulos estão dispostos da seguinte forma: Capítulo 1 – Introdução; Capítulo 2 - Considerações Botânicas; Capítulo 3 – Levantamento Bibliográfico; Capítulo 4 - Resultados e discussão; Capítulo 5 – Parte Experimental e Capítulo 6 – Conclusões. Todas as referências bibliográficas utilizadas estão dispostas no final do trabalho e foram citadas conforme as normas da UFC.

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae possui cerca de 307 gêneros e 6.900 espécies distribuídas principalmente nos trópicos e subtropicais. São plantas de hábito bastante variado, desde ervas, subarbustos, árvores, até trepadeiras, algumas vezes suculentas, com folhas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, laticíferas ou não (OLIVERIA; GIMENEZ; GODOY; 2007).

No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (CONEGERO *et al.*, 2003).

Dentre os gêneros brasileiros mais importantes estão o amazônico *Hevea* Aubl., e os mais amplamente distribuídos são *Croton* L., *Acalypha* L., *Cnidoscolus* Pohl., *Dalechampia* L., *Jatropha* L., e *Manihot* Mill (CARUZO, 2010).

Segundo SATIRO; ROQUE (2008) a família Euphorbiaceae é descrita como:

“Árvores, arbustos, subarbustos, ervas, trepadeiras ou lianas, laticíferas ou não, monoicas ou dioicas, com vários tipos de estruturas secretoras e tricomas tectores. Folhas alternas, raro opostas ou verticiladas, simples, raro compostas, inteiras a serradas; estípulas presentes ou não. Inflorescências racemosas ou cimosas, às vezes altamente modificadas, formando pseudantós, terminais ou axilares. Flores díclinas, actinomorfas, aclamídeas, monoclamídeas ou diclamídeas, pétalas e sépalas unidas ou livres; disco nectarífero frequentemente presente, segmentado ou inteiro. Androceu com 1 a muitos estames, livres ou unidos de diversas formas; anteras bitecas, rimosas, filetes curtos ou longos, livres ou variadamente concrecidos; pistilódio às vezes presente nas flores masculinas. Gineceu sincárpico, geralmente 3-carpelar, 3-locular, 1-2 óvulos por lóculo; ovário súpero, placentação axilar; estiletes geralmente 3, livres ou variadamente concrecidos. Fruto cápsula tricoca, raramente drupa, baga ou sâmara. Sementes com endosperma, carunculadas ou não.”

2.2 Considerações sobre o gênero *Cnidoscolus*

O gênero *Cnidoscolus* inclui cerca de 50-75 espécies exclusivas da América Tropical, dentre as quais 18 são encontradas no Brasil. A Região Nordeste é considerada um dos centros de diversidade do gênero, com 11 espécies (SÁTIRO; ROQUE, 2008).

Uma das características identificadas no gênero *Cnidoscolus* é a presença de tricomas urticantes em quase toda as suas partes vegetativas e florais, os quais, quando tocados,

provocam fortes dores localizadas, urticárias e até, em raros casos, desmaios (ARAÚJO; LEAL; QUIRINO, 2012).

Segundo MELO; SALES (2008) gênero *Cnidoscolus* Pohl é descrito como:

“Árvores, arbustos, subarbustos ou mais raramente ervas, monoicos, latescentes e com tricomas urticantes. Estípulas usualmente presentes. Pecíolo frequentemente longo, com ou sem glândulas. Folhas alternas, palmatilobadas, pinatilobadas ou inteiras, raramente palmatífidas e palmatinérvias. Inflorescência terminal (às vezes, pseudo-axilar), dicasial. Flores monoclâmídeas, unissexuais, as estaminadas nas ramificações distais e eixos terminais da inflorescência, tubulosas; as pistiladas nas terminações proximais, com segmentos do perianto livres ou parcialmente unidos. Estames 4-30, livres ou unidos em 2-6 verticilos heterodínamos, com diferentes graus de união, muitas vezes formando uma coluna conspícua; estaminódios 0-5, filiformes; grãos de pólen esferoidais ou oblato-esferoidais, pantoporados ou 3-zonocolpados, com exina de padrão croton. Ovário 3(-5) carpelar, óvulos 1 por lóculo, estiletos bífidos ou multífidos, livres ou parcialmente unidos. Fruto cápsula loculicida e septicida, raramente drupáceo. Sementes carunculadas, raramente não carunculadas, com endosperma conspícuo; embrião estreito, cotilédone largo e maior que a radícula”

2.3 Considerações sobre a espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*

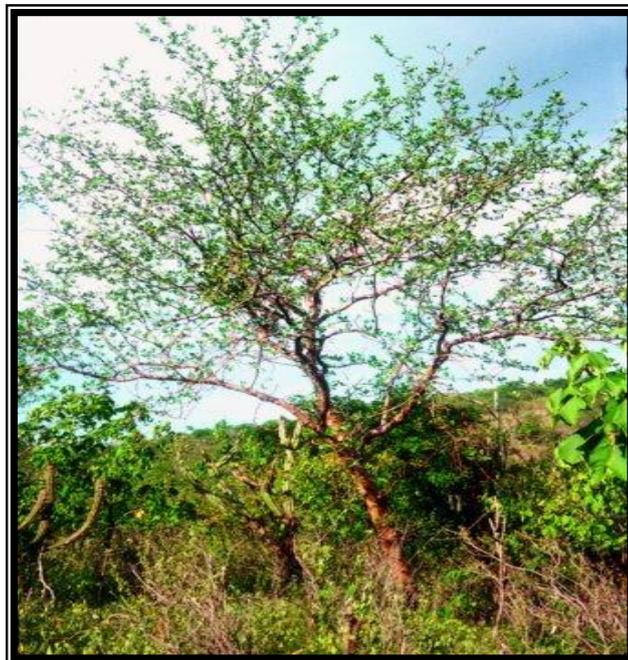
A faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (Muell. Arg.) Pax et K. Hoffman], pertencente à família das Euforbiáceas, é uma árvore tipicamente xerófila, podendo atingir até 4,0 m de altura, irregularmente esgalhada, lactescente; floresce durante um longo período do ano; suas folhas são longas, grossas, lanceoladas, recortadas, com pequenos acúleos no limbo, dotada ou não de espinhos urticantes (SOUZA, BATISTA, OLIVEIRA, 2012). Com nome popular de favela, é uma planta normalmente espinhosa comum na caatinga (OLIVEIRA et al, 2008). Devido à presença de espinhos urticantes em suas folhas e ao seu potencial tóxico por conta da presença do ácido cianídrico (HCN), a espécie deve ser manuseada de forma cuidadosa e manejada de modo a eliminar sua toxicidade antes de ser fornecida aos animais (SOUZA, BATISTA, OLIVEIRA, 2012).

Suas folhas secas e cascas são usadas como forragem para os burros e porcos e as sementes, como ração para frango durante os períodos de falta de chuva (LEMOS *et al.*, 1991).

A espécie apresenta potencial para exploração comercial, principalmente como planta forrageira. Tentativas de torná-la uma planta cultivada em maior escala estão sendo

implementadas, sendo desejável a ausência de espinhos nas folhas (BATISTA *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta foto da espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*.

Figura 1 - Fotografia de um espécime *Cnidoscolus phyllacanthus*.



Fonte: <http://www.cnip.org.br/banco_img/Faveleiro/cnidoscolusphyllacanthusmllargpaxkhoffm3.html>

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A faveleira, espécie endêmica do Brasil, faz parte do ecossistema da caatinga. Sua estrutura vegetal se constitui de diversos compostos químicos. Estudos anteriores (Tabela 1 e 2) realizados com esta espécie relatam a presença de vários tipos de substâncias, destacando-se os terpenoides, bis-nor-diterpeno, (nor = afixo usado para denotar a eliminação de um carbono) derivados do tricíclico benzociclohepteno favelina metil éter, favelina, deoxofavelina (ENDO; OHTA; NOZOE, 1991a), tetracíclico ciclopropano favelanona (ENDO; OHTA; NOZOE, 1991b), tetracíclico ciclobuteno neofavelanona (ENDO; OHTA; NOZOE, 1992), tricíclico benzocicloheptenona favelol, isofavelol, favelona (OHTA *et al.*, 1994a), favelóxido (OHTA *et al.*, 1994b), além do triterpenos com esqueleto lupano lupeol (MELO *et al.*, 2012), cinamato de lupeol, diidrocinaurato de lupeol (LEMOS *et al.*, 1991). Todos os compostos bis-nor-diterpeno foram avaliados quanto às atividades biológicas e constataram que possuem atividades citotóxicas, exceto os compostos favelol, isofavelol e favelona (ENDO; OHTA; NOZOE, 1991a). Neste estudo os compostos foram testados contra células tumorais.

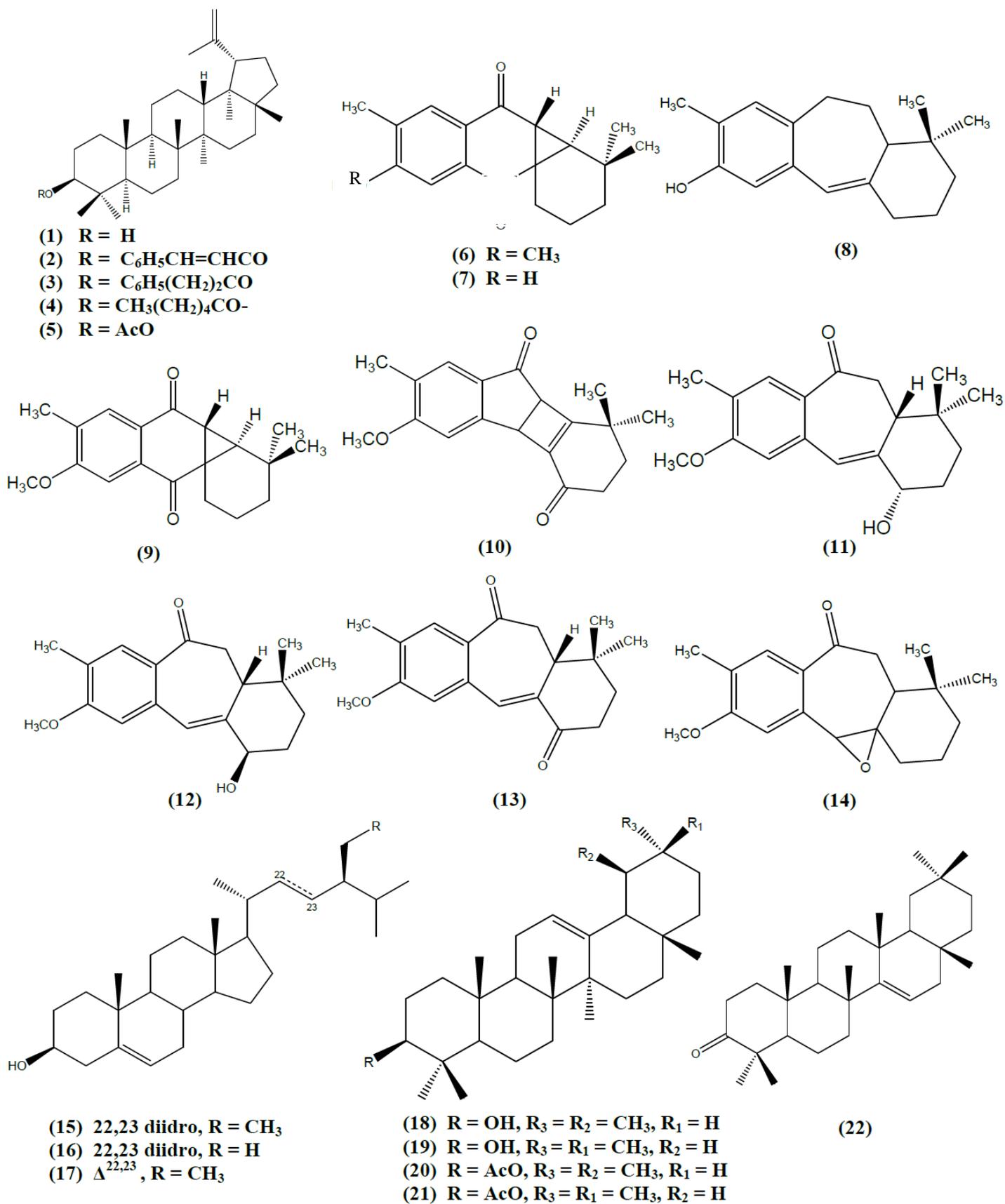
A ocorrência de nonanoato de lupeol, cinamato de lupeol e diidrocinaurato de lupeol em *C. phyllacanthus*, juntamente com a presença de cinamato de lupeol, 3- β -*O*-acetil-lupeol e 3- β -*O*-fenilpropanoil-lupeol em *Cnidoscopus elasticus*, (CABALLERO *et al.*, 1984; DOMINGUEZ *et al.*, 1982) de cinamato de lupeol e diidrocinaurato de lupeol, 3- β -*O*-acetil-lupeol e 3- β -*O*-hexanoil-lupeol em *Cnidoscopus vitifolius* (BRUM *et al.*, 1998) e de 3- β -*O*-acetil-lupeol em *Cnidoscopus urens* (BHATTACHARYYA; BARROS, 1986) sugerem que estes derivados acilados do lupeol podem ser usados como marcadores quimiotaxômicos deste gênero.

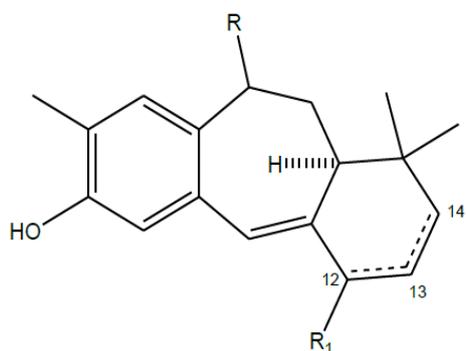
A espécie apresenta também como atividade biológica propriedades desinfetantes e cicatrizantes. A cataplasma da entrecasca é o medicamento usado para cicatrização de ferimentos e contra infecções ovarianas e gerais, sendo o látex utilizado contra inflamações no ovário e gerais, e utilizado contra as dermatoses e na cicatrização de verrugas (CANDIDO, 2011).

Possui indicações terapêuticas para hemorroidas, problemas renais, doenças oftalmológicas, sopro, lesões, fraturas, verrugas, problemas de pele, a limpeza dos olhos, infecção urinária, inflamação do útero, ovário, da próstata, inflamações em geral (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

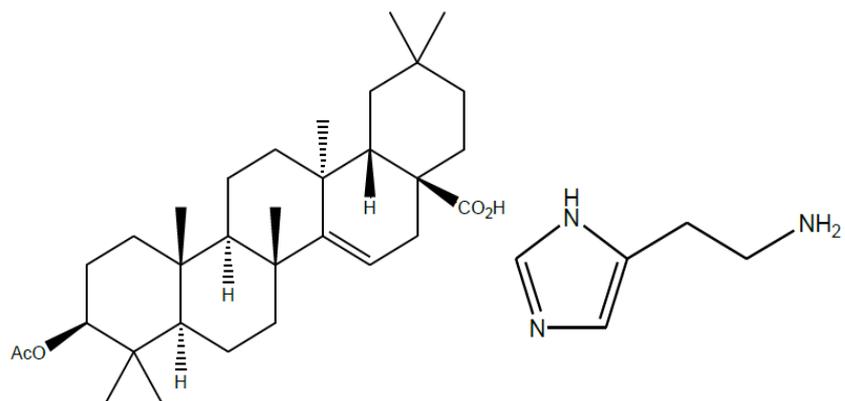
Os extratos de *Cnidocolus phyllacanthus* são eficazes contra larvas e pupas do *Aedes Aegypti* (CANDIDO, 2013).

A literatura reporta algumas patentes de alguns derivados como a síntese de benzocicloheptenos substituídos por oxigênio como valiosos produtos intermediários para a preparação de estrogênios seletivos em tecidos. A presente invenção refere-se a produtos intermediários e a um novo processo para a preparação do benzociclohepteno. O processo de acordo com a invenção para a preparação desses novos produtos intermediários parte de materiais de partida com preço favorável, fornece as etapas intermediárias em altos rendimentos e alta pureza, sem etapas de purificação cromatográficas e permite a preparação em grande escala técnica (SCHERING, 2004). Os novos compostos dispõem de eficácia estrogênica seletiva no osso e são adequados para a preparação de medicamentos, especialmente para a profilaxia e terapia da osteoporose (SCHERING, 2001).

Tabela 1- Estruturas das substâncias isoladas de *Cnidoscolus*

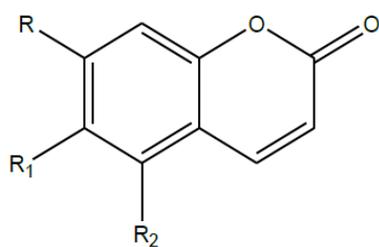


- (23) $R = H, R_1 = O, \Delta^{13,14}$
 (24) $R = O, R_1 = H, \Delta^{12,13}$
 (25) $R = O, R_1 = O, \Delta^{13,14}$

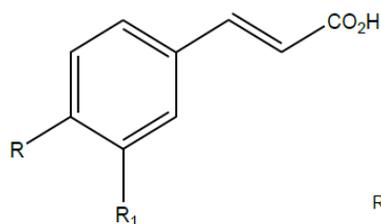


(26)

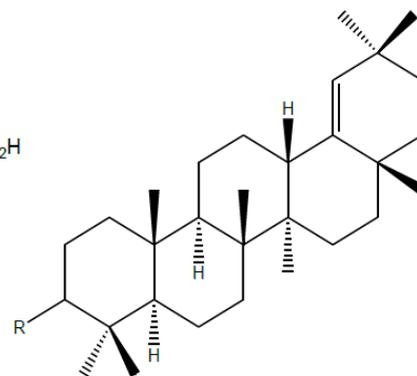
(27)



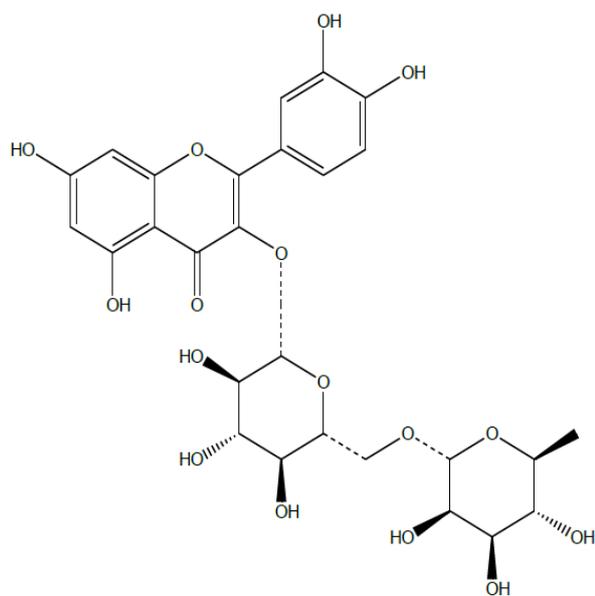
- (28) $R = OH, R_1 = OMe, R_2 = H$
 (29) $R = OMe, R_1 = OH, R_2 = H$
 (30) $R = OMe, R_1 = OH, R_2 = OMe$



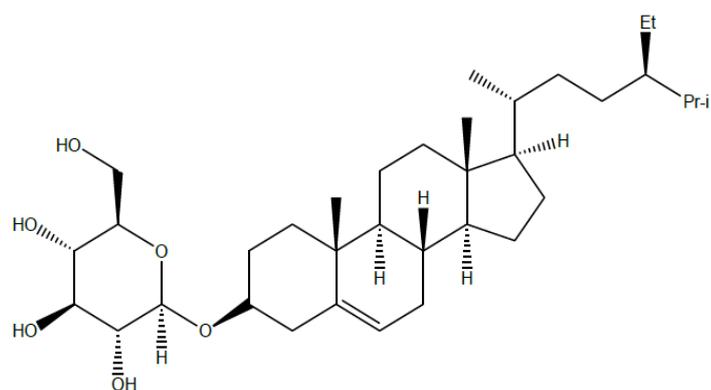
- (31) $R = EtO, R_1 = H$
 (32) $R = OH, R_1 = H$
 (33) $R = OH, R_1 = OMe$



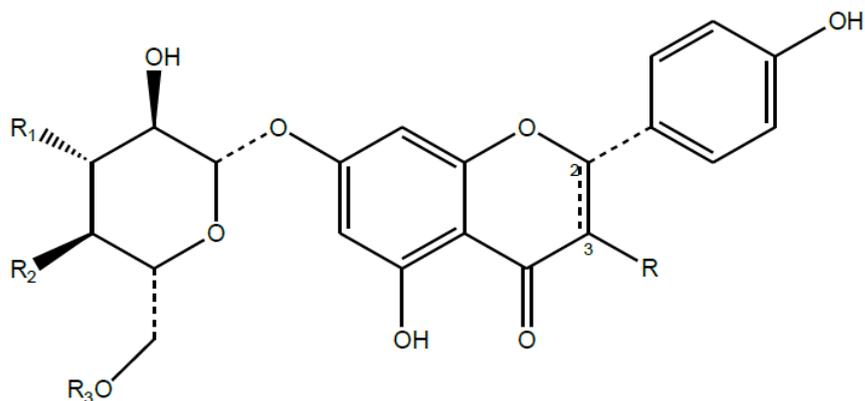
- (34) $R = OH$
 (35) $R = AcO$



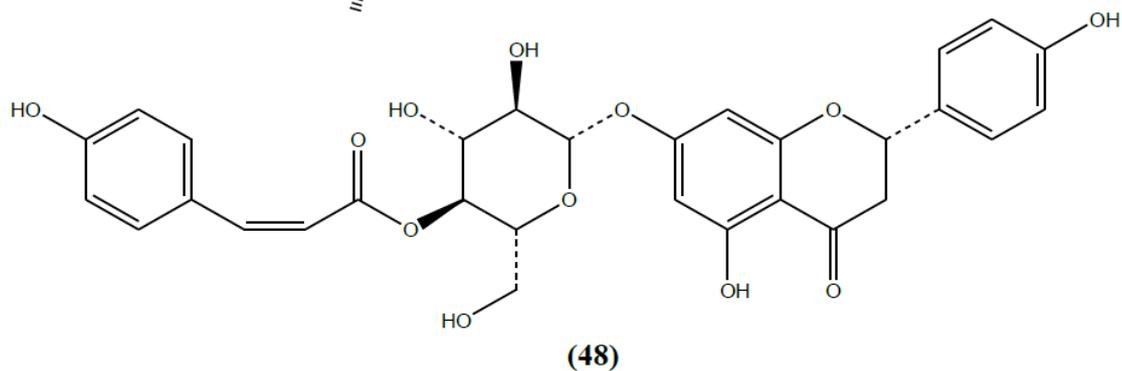
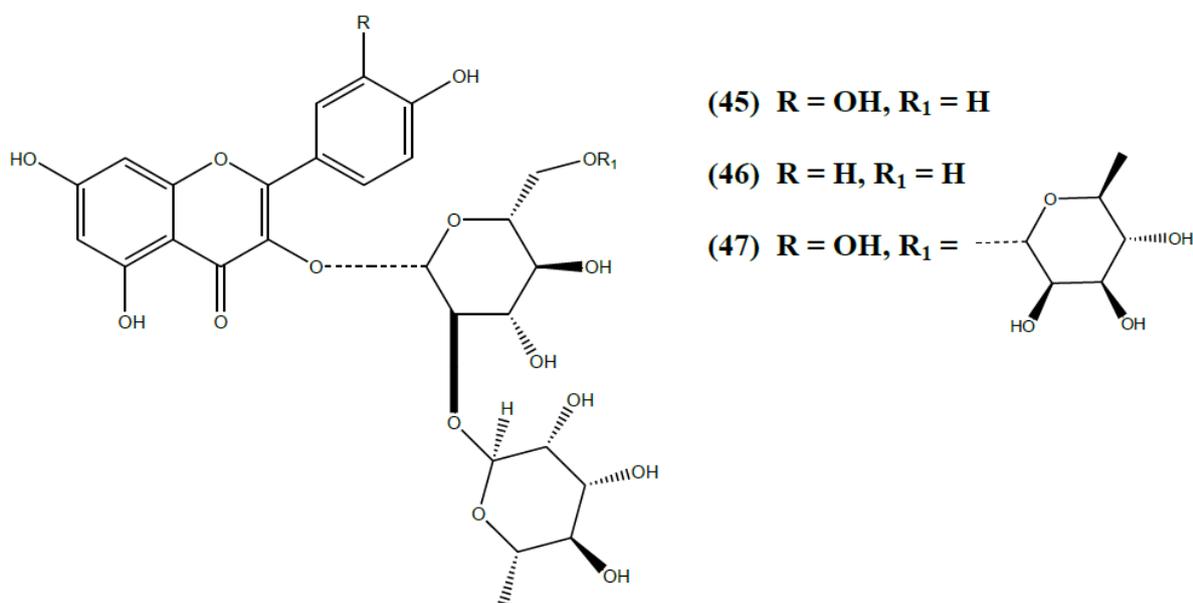
(36)



(37)



- (38) $\Delta^{2,3}$, R = H, R₁ = R₃ = $\text{COCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$, R₂ = OH
 (39) $\Delta^{2,3}$, R = H, R₁ = R₂ = OH, R₃ = $\text{OCOCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$
 (40) 2,3 diidro, R = H, R₁ = R₂ = OH, R₃ = $\text{OCOCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$
 (41) 2,3 diidro, R = H, R₁ = R₃ = $\text{COCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$, R₂ = OH
 (42) 2,3 diidro, R = OH, R₁ = R₃ = $\text{COCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$, R₂ = OH
 (43) 2,3 diidro, R = H, R₁ = OH, R₂ = R₃ = $\text{COCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$
 (44) 2,3 diidro, R = OH, R₁ = OH, R₂ = $\text{OCOCH=CHC}_6\text{H}_4\text{OH}$, R₃ = H



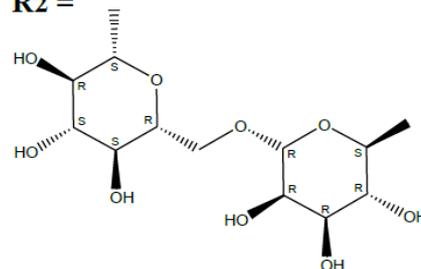
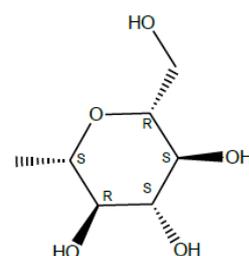
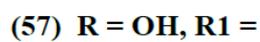
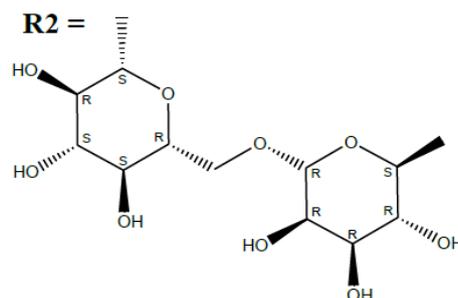
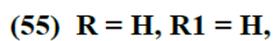
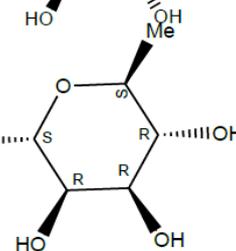
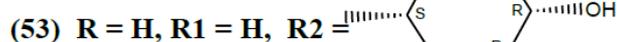
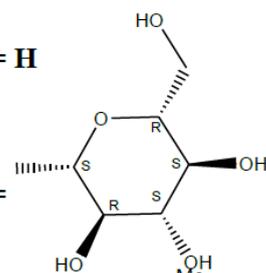
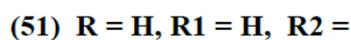
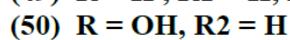
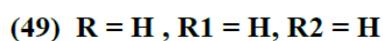
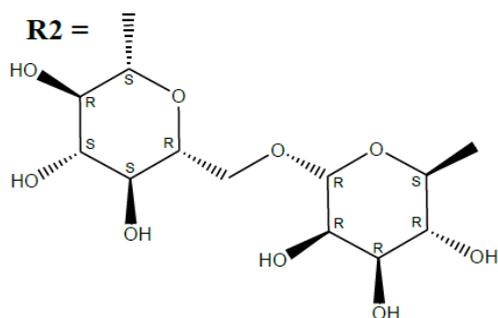
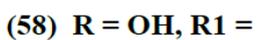
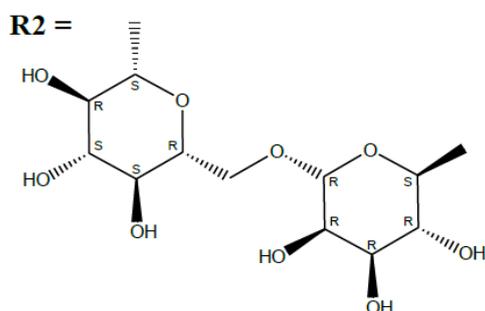
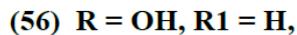
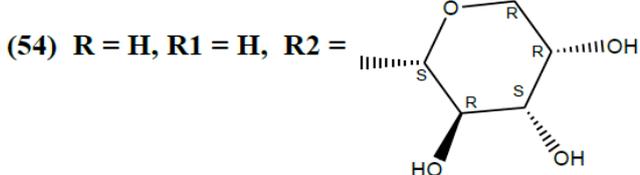
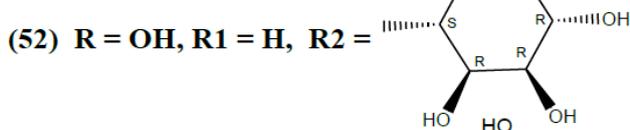
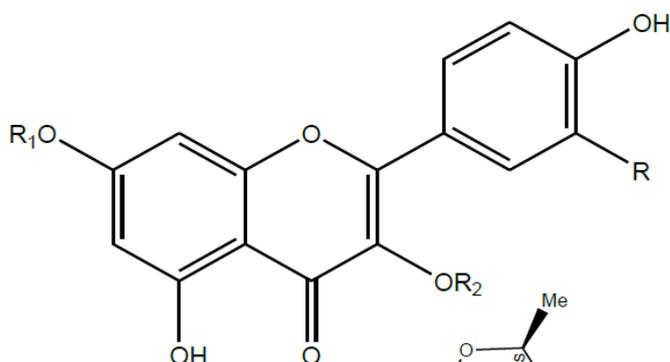


Tabela 2- Substâncias isoladas de *Cnidocolus*.

Substância	Estrutura	Referências
Lupeol	1	MELO <i>et al.</i> , 2012 YUAN <i>et al.</i> , 2007
Cinamato de lupeol	2	BRUM <i>et al.</i> , 1998 CABALLERO <i>et al.</i> , 1984 LEMOS <i>et al.</i> , 1991
Diidrocinaamato de lupeol	3	BRUM <i>et al.</i> , 1998 CABALLERO <i>et al.</i> , 1984 LEMOS <i>et al.</i> , 1991
Hexanoato de lupeol	4	BRUM <i>et al.</i> , 1998
Acetato de lupeol	5	BRUM <i>et al.</i> , 1998 CABALLERO <i>et al.</i> , 1984 DELGADO <i>et al.</i> , 1994 DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 1992 YUAN <i>et al.</i> , 2007
Favelina metil éter	6	ENDO ; OHTA; NOZOE, 1991a
Favelina	7	ENDO ; OHTA; NOZOE, 1991 ^a
Deoxofavelina	8	ENDO ; OHTA; NOZOE, 1991 ^a
Favelanona	9	ENDO ; OHTA; NOZOE, 1991b
Neofavelanona	10	ENDO ; OHTA; NOZOE, 1992
Favelol	11	OHTA <i>et al.</i> , 1994 ^a
Isofavelol	12	OHTA <i>et al.</i> , 1994a
Favelona	13	OHTA <i>et al.</i> , 1994a
Favelóxido	14	OHTA <i>et al.</i> , 1994b
Sitosterol	15	DELGADO <i>et al.</i> , 1994 RAMIREZ-GONZALLEZ; VILLALOBOS, 2008
Campesterol	16	BRUM <i>et al.</i> , 1998
Estigmasterol	17	BRUM <i>et al.</i> , 1998
α -amirina	18	RAMIREZ-GONZALLEZ; VILLALOBOS, 2008
β -amirina	19	RAMIREZ-GONZALLEZ; VILLALOBOS, 2008
Acetato de α -amirina	20	RAMIREZ-GONZALLEZ; VILLALOBOS, 2008

Acetato de β -amirina	21	RAMIREZ-GONZALEZ; VILLALOBOS, 2008
Taraxerona	22	RAMIREZ-GONZALEZ; VILLALOBOS, 2008
Xochitlolona	23	DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 1992
Isoxochitlolona	24	DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 1992
Xochitloldiona	25	DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 1992
Ácido 3-acetilaleuritocólico	26	BRUM <i>et al.</i> , 1998
Histamina	27	CORDEIOR; ARAGÃO; MORHY, 1983
Escopoletina	28	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Isoescopoletina	29	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Fraxinol	30	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido 4-etoxicinámico	31	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido 4-hidroxicinámico	32	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido ferúlico	33	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Germanicol	34	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Acetato de germanicol	35	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Rutina	36	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Daucosterol	37	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Anisofolina	38	YUAN <i>et al.</i> , 2007
4H-1-Benzopiran-4-one, 5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)- 7-[[6-O-[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-1-oxo-2-propen-1-il]- β -D-glicopiranosil]oxi]-	39	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Naringenina 7-O-(6"-E-p-coumaroil- β -D- glicopiranosídeo)	40	YUAN <i>et al.</i> , 2007
4H-1-Benzopiran-4-ona, 7-[[3,6-bis-O-[(2E)-3-(4- hidroxifenil)-1-oxo-2-propen-1-il]- β -D-glicopiranosil] oxi]-2,3-diidro-5-hidroxi-2	41	YUAN <i>et al.</i> , 2007
4H-1-Benzopiran-4-ona, 7-[[3,6-bis-O-[(2E)-3-(4- hidroxifenil)-1-oxo-2-propen-1-il]- β -D- glicopiranosil]oxi]-2,3-diidro-3,5-dihidroxi-2-(4- hidroxifenil)-, (2R,3R)	42	YUAN <i>et al.</i> , 2007
4H-1-Benzopiran-4-ona, 7-[[4,6-bis-O-[(2E)-3-(4-	43	YUAN <i>et al.</i> , 2007

hidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]- β -D-glicopiranosil] oxi]-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)		
4H-1-Benzopiran-4-ona, 2,3-diidro-3,5-diidroxi-2-(4- hidroxifenil)-7-[[4-O-[(2E)-3-(4-hidroxifenil)-1-oxo- 2-propen-1-il]- β -D-glucopiranosil]oxi]-, (2R,3R)-	44	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Quercetina 3-neohesperidosideo	45	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Canferol 3-neohesperidosideo	46	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Quercetina-3-O-(2-ramnosil) rutinosideo	47	YUAN <i>et al.</i> , 2007
4H-1-Benzopiran-4-ona, 2,3-diidro-5-hidroxi-2-(4- hidroxifenil)-7-[[4-O-[(2Z)-3-(4-hidroxifenil)-1-oxo- 2-propen-1-il]- β -D-glicopiranosil]oxi]-, (2S)-	48	YUAN <i>et al.</i> , 2007
Canferol	49	KUTI, KONURU, 2004
Quercetina	50	KUTI, KONURU, 2004
Astragalina	51	KUTI, KONURU, 2004
Quercitrina	53	KUTI, KONURU, 2004
Afelina	52	KUTI, KONURU, 2004
Trifolina	54	KUTI, KONURU, 2004
Canferol 3-ramnosilglicosideo	55	KUTI, KONURU, 2004
Quercetina -3-O-ramnosilglicosideo	56	KUTI, KONURU, 2004
Flavona, 3,4',5,7-tetrahidroxi-, 7-glicosideo 3-(O- ramnosilglicosideo) (7CI)	57	KUTI, KONURU, 2004
4H-1-Benzopiran-4-ona, 7-[(6-deoksi- α -I mannopiranosil)oxi]-3-[[O-(6-deoksi- α -L- mannopiranosil)- β -D-galactopiranosil]oxi]-5-hidroxi-2- (4-hidroxifenil)- (9CI)	58	KUTI, KONURU, 2004

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de *Cnidoscolus phyllacanthus*

4.1.1 Determinação estrutural de CCF-1

Na saponificação, onde o extrato hexânico da casca do caule passou por um processo de hidrólise básica, foram geradas as frações saponificáveis e insaponificáveis.

O tratamento cromatográfico da fração insaponificável (208,5 g), obtidos no processo de saponificação do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus* forneceu 160,8 mg de um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano, com ponto de fusão na faixa de 210-212 °C, que foi denominado CCF-1 (Fig. 3, p. 28).

No espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 4, p. 30), utilizando-se KBr, ν_{\max} cm^{-1} , observou-se a presença de absorção característica de hidroxila em 3393 cm^{-1} ; 1038 cm^{-1} de C-O; 1640 cm^{-1} de C=C.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125MHz, CDCl_3] (Fig. 6, p. 31) mostrou 30 átomos de carbono, sendo o sinal δ_{c} 79,2 referente a um carbono carbinólico e dois sinais em δ_{c} 151,1 e δ_{c} 109,5 referentes a carbonos olefínicos. Após análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 7, p. 31), verificou-se a presença de seis carbonos metínicos (CH), onze carbonos metilênicos (CH_2), sete carbonos metílicos (CH_3) e seis carbonos não hidrogenados (C).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 5, p. 30) revelou sete sinais de hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,68, δ_{H} 1,03, δ_{H} 0,96, δ_{H} 0,94, δ_{H} 0,83, δ_{H} 0,79, δ_{H} 0,76, ainda observa-se um duplo dubleto em δ_{H} 3,20 (dd, $J = 4,8 \text{ Hz}$ e $J = 11,25 \text{ Hz}$) referente ao hidrogênio carbinólico, apresentou também sinal em δ_{H} 4,69 (sl) e δ_{H} 4,57 (sl) atribuídos aos dois hidrogênios da dupla terminal e sinal em δ_{H} 2,37 (m, $J = 5,6 \text{ Hz}$) de hidrogênio ligado a carbono alílico.

Com base nos dados obtidos e comparação com dados espectrais registrados na literatura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007) (Tabela 3, p. 29), concluiu-se que a substância CCF-1 trata-se de um triterpeno conhecido como lupeol (Lup-20(29)-en-3-ol ou 3 β -Hidroxilup-20(29)-eno) (Figura 3), já isolado anteriormente da espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*.

Figura 3 – Estrutura de CCF-1

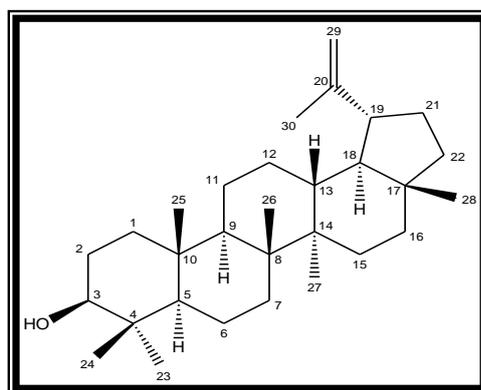


Tabela 3- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de CCF-1

C	CCF-1		Literatura*	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
4	39,1	-	39,1	-
8	41,1	-	41,05	-
10	37,4	-	37,4	-
14	43,1	-	43,05	-
17	43,2	-	43,2	-
20	151,2	-	151,1	-
CH				
3	79,2	3,20 (dd, $J=4,8$ Hz, $J=11,25$ Hz)	79,2	3,20
5	55,5	-	55,5	-
9	50,7	-	50,7	-
13	38,3	-	38,2	-
18	48,5	-	48,5	-
19	48,2	2,37 (m, $J=5,6$ Hz)	48,2	2,37 ($J=5,4$ Hz)
CH₂				
1	38,9	-	38,9	-
2	27,6	-	27,6	-
6	18,5	-	18,5	-
7	34,5	-	34,4	-
11	21,2	-	21,1	-
12	25,4	-	25,3	-
15	27,7	-	27,6	-
16	35,8	-	35,8	-
21	30,1	-	30,05	-
22	40,2	-	40,2	-
29	109,5	4,68 (s), 4,56 (s)	109,5	4,69 (s), 4,57 (s)
CH₃				
23	28,2	1,03 (s)	28,2	1,03
24	15,6	0,83 (s)	15,6	0,83
25	16,3	0,76 (s)	16,3	0,76
26	16,2	0,94 (s)	16,2	0,95
27	14,8	0,96 (s)	14,7	0,97
28	18,2	0,79 (s)	18,2	0,79
30	19,5	1,68 (s)	19,5	1,58

*ALBUQUERQUE (2007)

Dados espectroscópicos da substância CCF-1

Figura 4 - Espectro na região do infravermelho de CCF-1

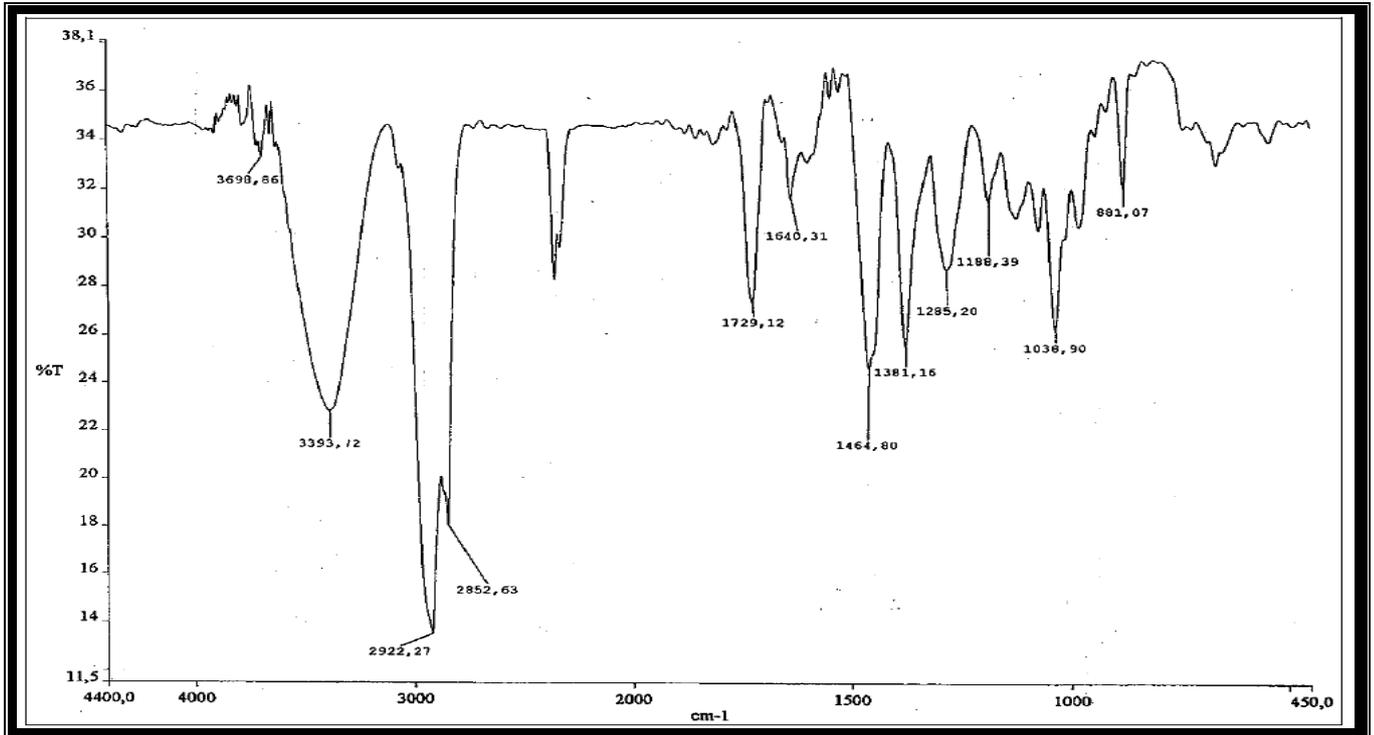


Figura 5 - Espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] de CCF-1

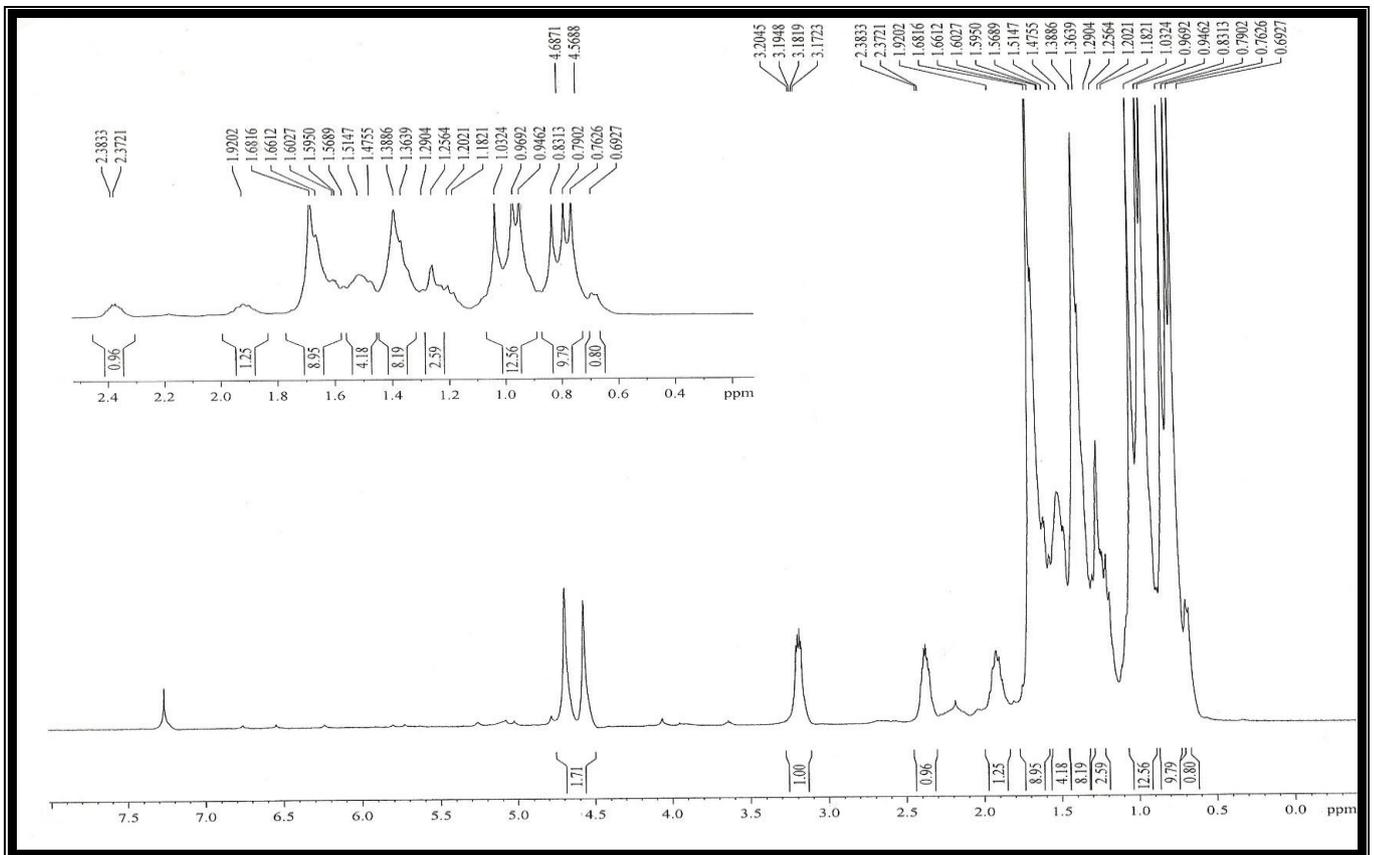
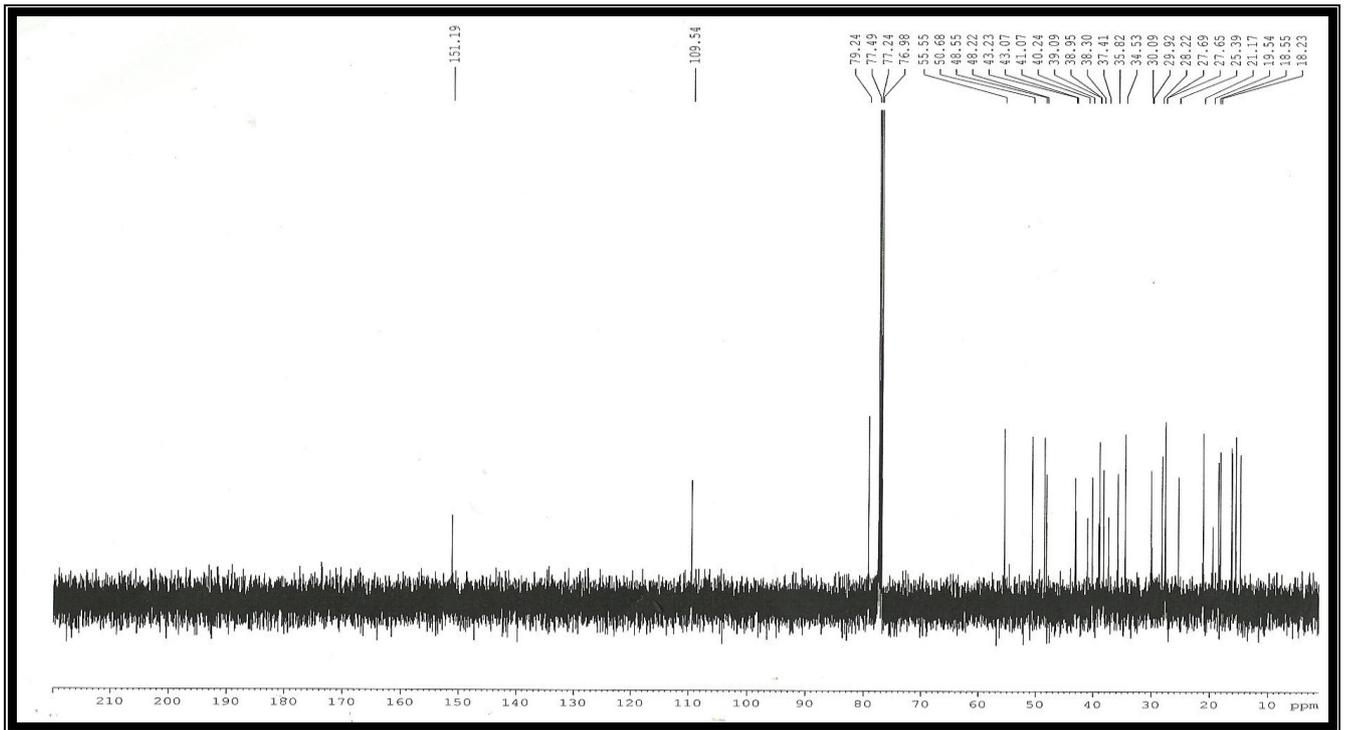
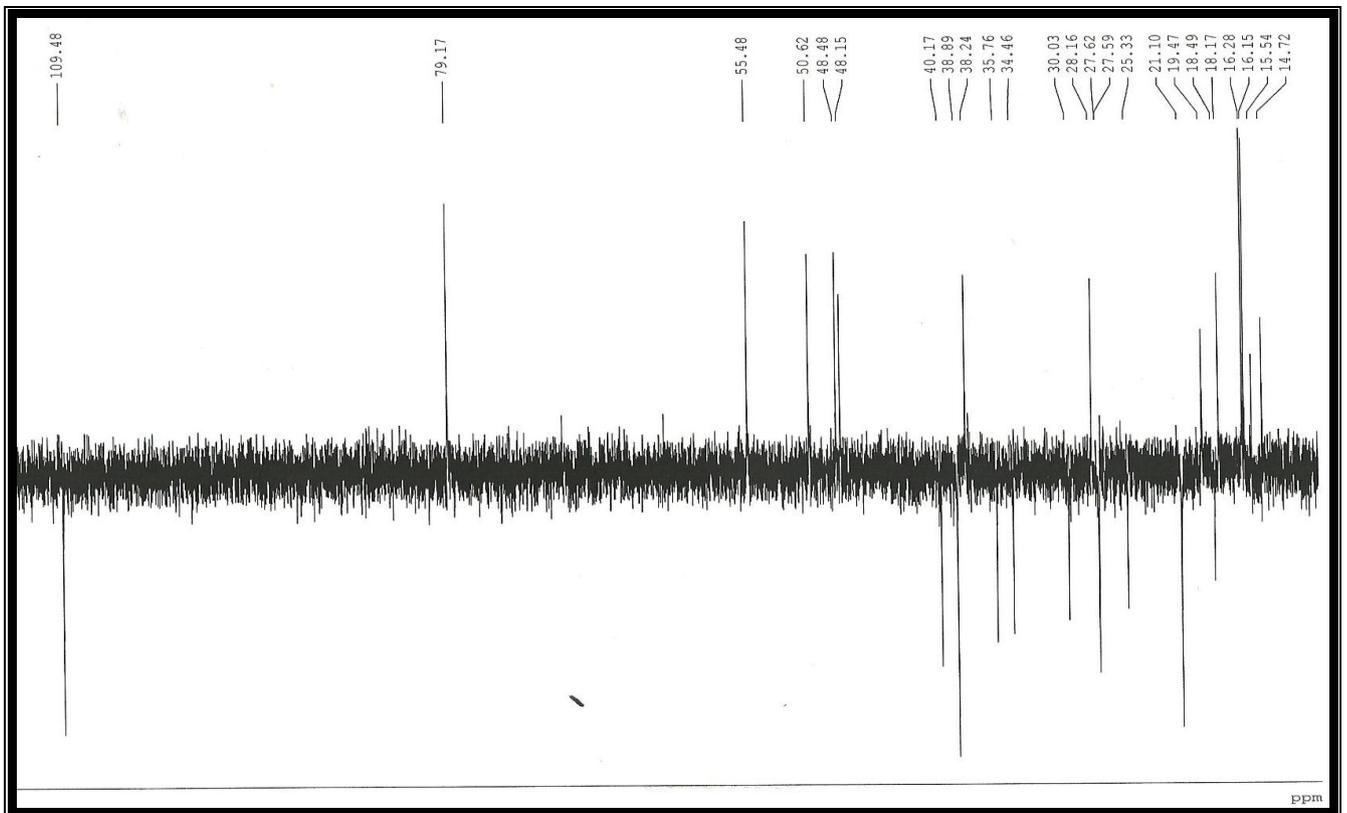


Figura 6 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-1Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-1

4.1.2 Determinação Estrutural CCF-2

O fracionamento cromatográfico da fração hexano (EHCCFH) do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidioscolus phyllacanthus* forneceu 98 mg de um sólido branco, solúvel em diclorometano, com ponto de fusão na faixa de 131-133 °C que foi denominado CCF-2 (Figura 10, p. 33).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 11, p. 35) revelou bandas de absorções de deformação axial de ligação C-H de alifático entre 2919 a 2850 cm^{-1} , uma banda de absorção em 1734 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster, absorções referentes à deformação axial de ligação C=C de olefínico em 1639 cm^{-1} , assim como absorção de deformação axial de ligação C-O em 1009 cm^{-1} .

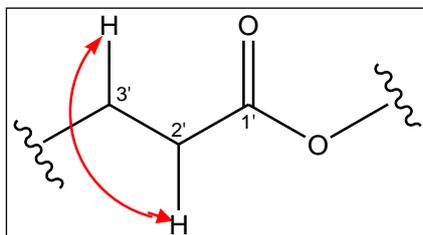
O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 14, p. 36) registrou um total de 39 linhas espectrais, sendo dois sinais em δ_{C} 151,1 e δ_{C} 109,5 referentes a carbonos olefínicos, semelhantes aos sinais do lupeol (CCF-1). Os sinais em δ_{C} 80,3 e δ_{C} 173,8 foram atribuídos a carbono sp^3 oxigenado e a carbonila de éster. Após análise e comparação com os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 15, p. 37), verificou-se a presença de 6 carbonos metínicos (CH), 18 carbonos metilênicos (CH_2), 8 carbonos metílicos (CH_3) e 7 carbonos não hidrogenados (C). Os dados de RMN ^{13}C para CCF-2, interpretados na Tabela 4 (p. 34), confirmam tratar-se de um éster do lupeol.

O espectro de massa de alta resolução de CCF-2 obtido através da ionização por eletrospray (ESI) no modo no modo negativo (Fig. 12, p. 35) forneceu o pico correspondente ao íon molecular em m/z 565,4162 $[\text{M}-\text{H}]^-$ confirmando a fórmula molecular do composto $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_2$ (CCF-2).

A análise do espectro de RMN ^1H (Fig. 13, p. 36) permitiu identificar sinais de hidrogênios de metila em δ_{H} 0,79 (s); δ_{H} 0,84 (s); δ_{H} 0,85 (s); δ_{H} 0,86 (s); δ_{H} 0,89 (s); δ_{H} 0,95 (s); δ_{H} 1,04 (s) e δ_{H} 1,69 (sl), referentes às metilas ligadas à dupla ligação, um dubleto em δ_{H} 4,69 ($J=2,1$ Hz) e um em torno de δ_{H} 4,57, atribuído a hidrogênios de um grupo vinílico (H-29a e H-29b, respectivamente) semelhantes aos sinais do lupeol (CCF-1). Um duplo dubleto em δ_{H} 4,47 ($J=10,7$ e $5,5$ Hz) indica a presença de um éster. Os sinais em δ_{H} 1,25 correspondente aos hidrogênios de vários grupos CH_2 , em δ_{H} 0,89 correspondente a hidrogênio um grupo metila e em δ_{H} 2,29 (t, $J=6,7$ Hz) correspondente a hidrogênios metilênicos de carbono ligado à carbonila do éster caracterizam a presença de um éster alifático ligado ao C-3.

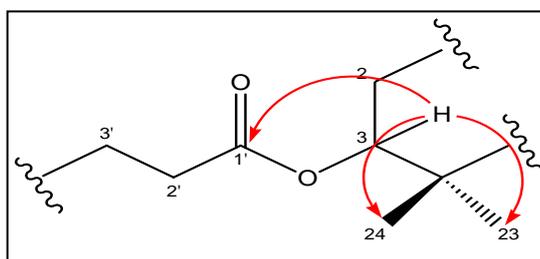
O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Fig.16, p. 37) de CCF-2 mostrou acoplamento vicinal (Fig. 8) entre os átomos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,29 (t, $J=6,7$ Hz, H-2') com δ_{H} 1,66 (H-3').

Figura 8 - Subestrutura 1 de CCF-2



Para determinar a estrutura final do triterpeno isolado, analisou-se o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação, com detecção no canal do hidrogênio (HMBC) (Fig. 17, p. 38) onde ficaram evidenciados os acoplamentos à distância ($^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$) (Fig. 9) entre hidrogênios e carbonos (Tabela 4, p. 34). A verificação de que a hidroxila da posição 3 do triterpeno lupeol está na forma de um éster foi confirmada pelas correlações do hidrogênio em δ_{H} 4,47 (dd, $J=10,8$ Hz, $J=5,6$ Hz) (H-3) com os carbonos em δ_{C} 173,8 (C-1'), δ_{C} 16,6 (C-24) e δ_{C} 28,14 (C-23). (Fig. 9).

Figura 9 – Subestrutura 2 de CCF-2



Baseando-se em todas as informações espectrais obtidas (Tabela 4, p. 34), verificou-se que CCF-2 trata-se de um éster do lupeol que foi identificado como nonanoato de lupeol (Fig. 10) e que está sendo relatado pela primeira vez na espécie *Cnidoscopus phyllacanthus*.

Figura 10 – Estrutura de CCF-2

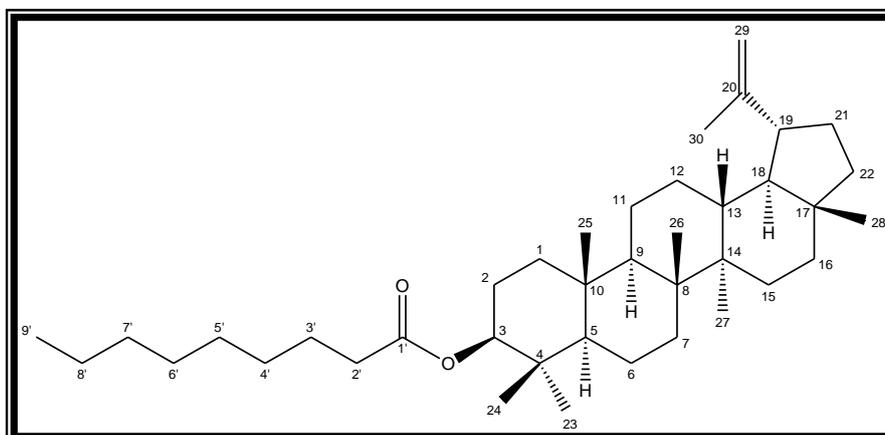


Tabela 4 - Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-2, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.

	HSQC		HMBC		HL*
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
4	38,1	-	3H-23; 3H-24		37,8
8	41,1	-	3H-26	3H-27	40,8
10	37,3	-	3H-25		37,1
14	43,1	-	3H-27	H-18; 3H-26	42,8
17	43,7	-	3H-28		43,0
20	151,1	-	H-19; 3H-30	H-18	151,0
1'	173,8		2H-2'	H-3; 2H-3'	173,7
CH					
3	80,8	4,47 (dd, 10,8, 5,6)		3H-23; 3H-24	80,6
5	55,5	0,90		3H-23; 3H-24; 3H-25	55,3
9	50,4	1,30		3H-25; 3H-26	50,3
13	38,1	1,68		3H-27	38,0
18	48,4	1,37	H-19	3H-28	48,3
19	48,1	2,79 (m)	H-18	2H-29; 3H-30	48,0
CH₂					
1	38,5	1,65, 1,20		3H-25	38,3
2	23,8	1,60			23,4
6	18,3	1,50			18,2
7	34,3	1,42, 1,35		3H-26	34,2
11	21,0	1,96			20,9
12	24,9	1,60, 1,06			25,1
15	27,5	1,69, 1,05		3H-27	27,4
16	34,9	1,47, 1,38		3H-28	35,5
21	29,9	1,92, 1,28			29,8
22	40,1	1,40, 1,20		H-19, 3H-28	40,0
29	109,4	4,69 (d), 4,57 (d)		H-19; 3H-30	109,32
2'	35,7	2,29 (t, 6,7)			34,8
3'	25,2	1,66	2H-2'		24,8
4'	29,9	1,25	2H-4'		31,3
5'	29,9	1,25			22,3
6'	29,9	1,25			13,9
7'	31,4	1,30		2H-2'; 2H-9'	-
8'	22,4	0,43	2H-7' 3H-9'		-
CH₃					
23	28,1	0,85 (s)		3H-24	27,9
24	16,6	0,84 (s)		H-3, 3H-23	16,6
25	16,2	0,86 (s)			16,2
26	16,1	1,04 (s)			15,9
27	14,6	0,95 (s)			14,5
28	18,1	0,79 (s)			18,0
30	19,5	1,69 (sl)		H-19, 2H-29	19,3
9'	14,2	0,89 (m)			-

*HL=Hexanoato de lupeol (BRUM et al., 1997).

Dados espectroscópicos da substância CCF-2

Figura 11 - Espectro na região do infravermelho de CCF-2

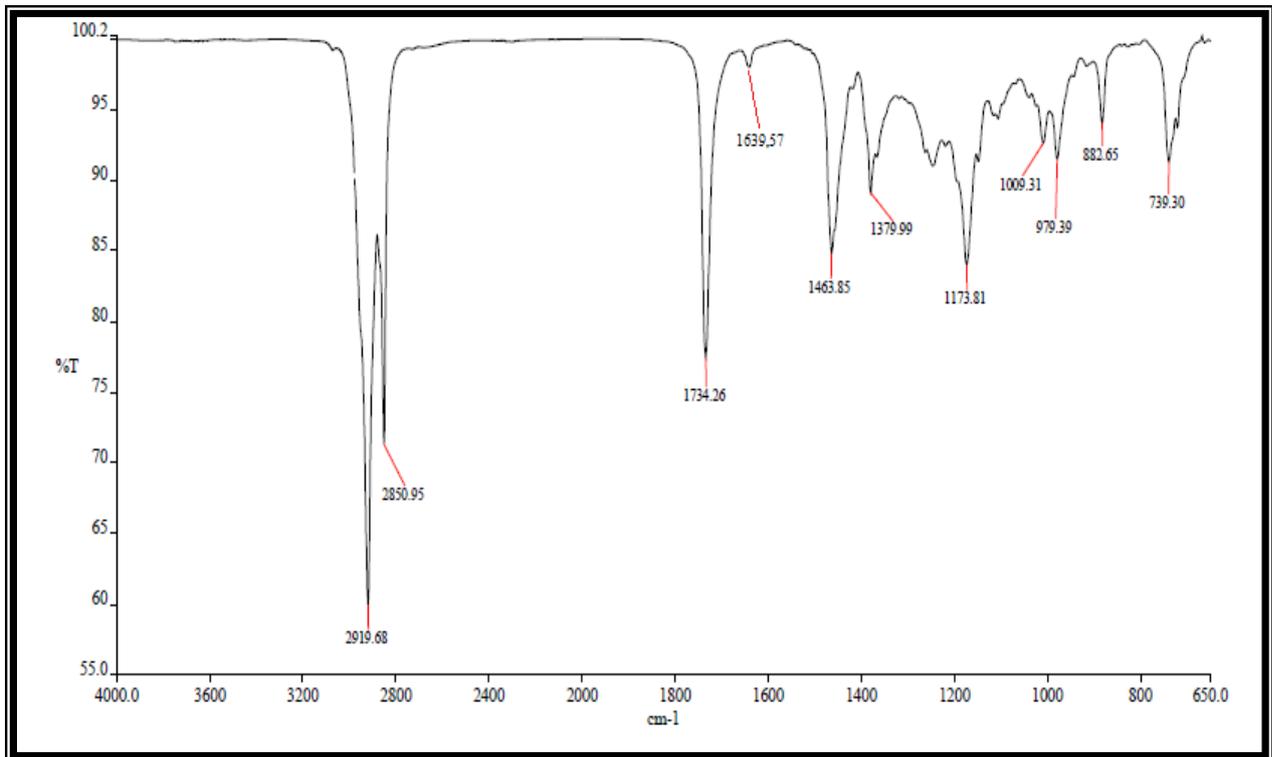


Figura 12 - Espectro de massa (EM-ESI (-)) de CCF-2

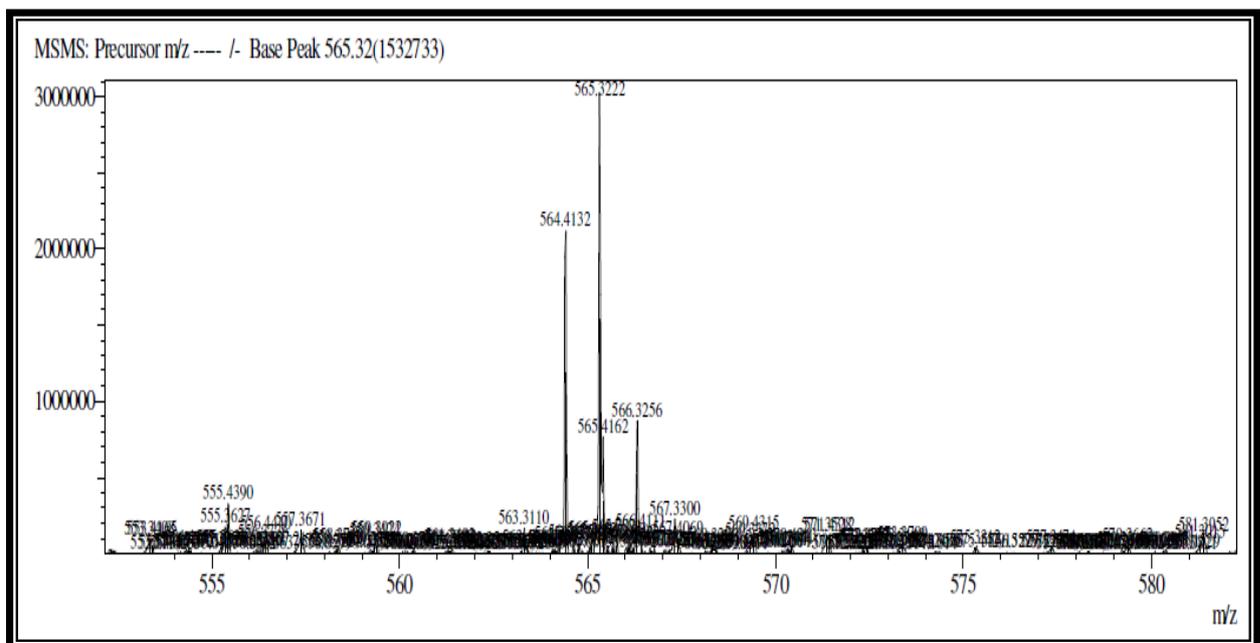


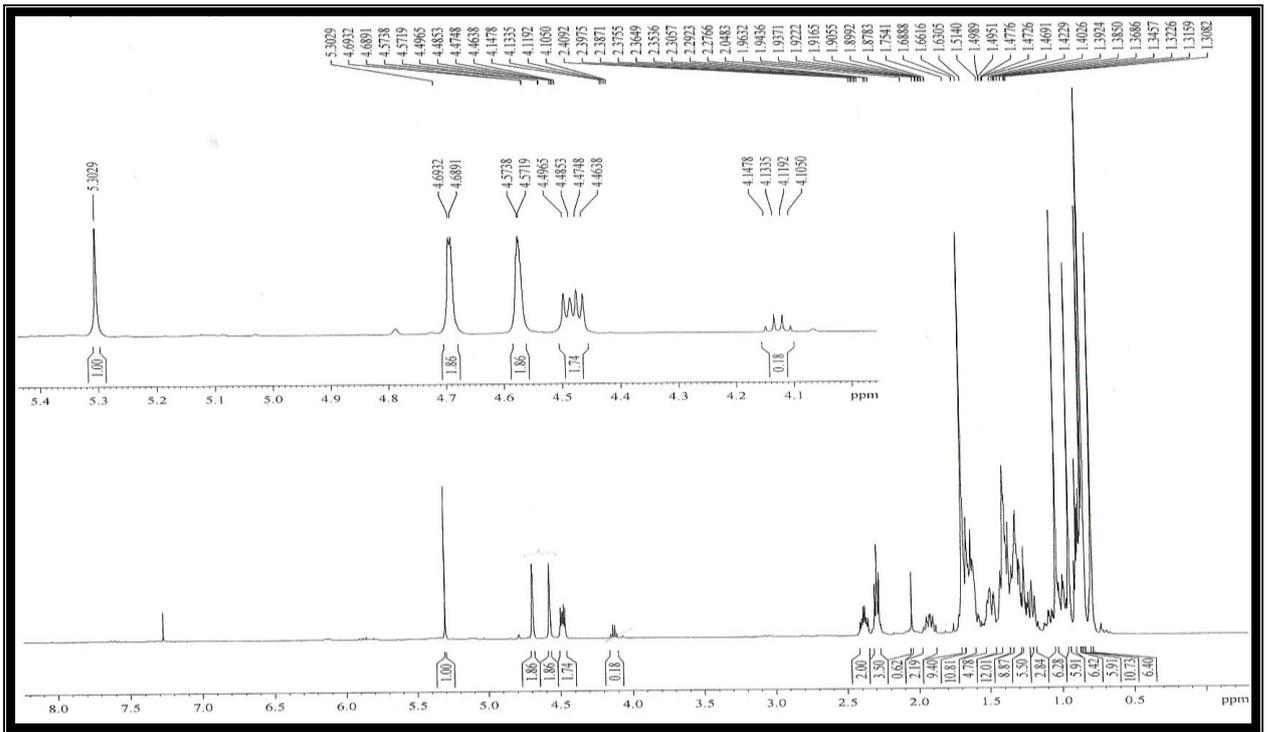
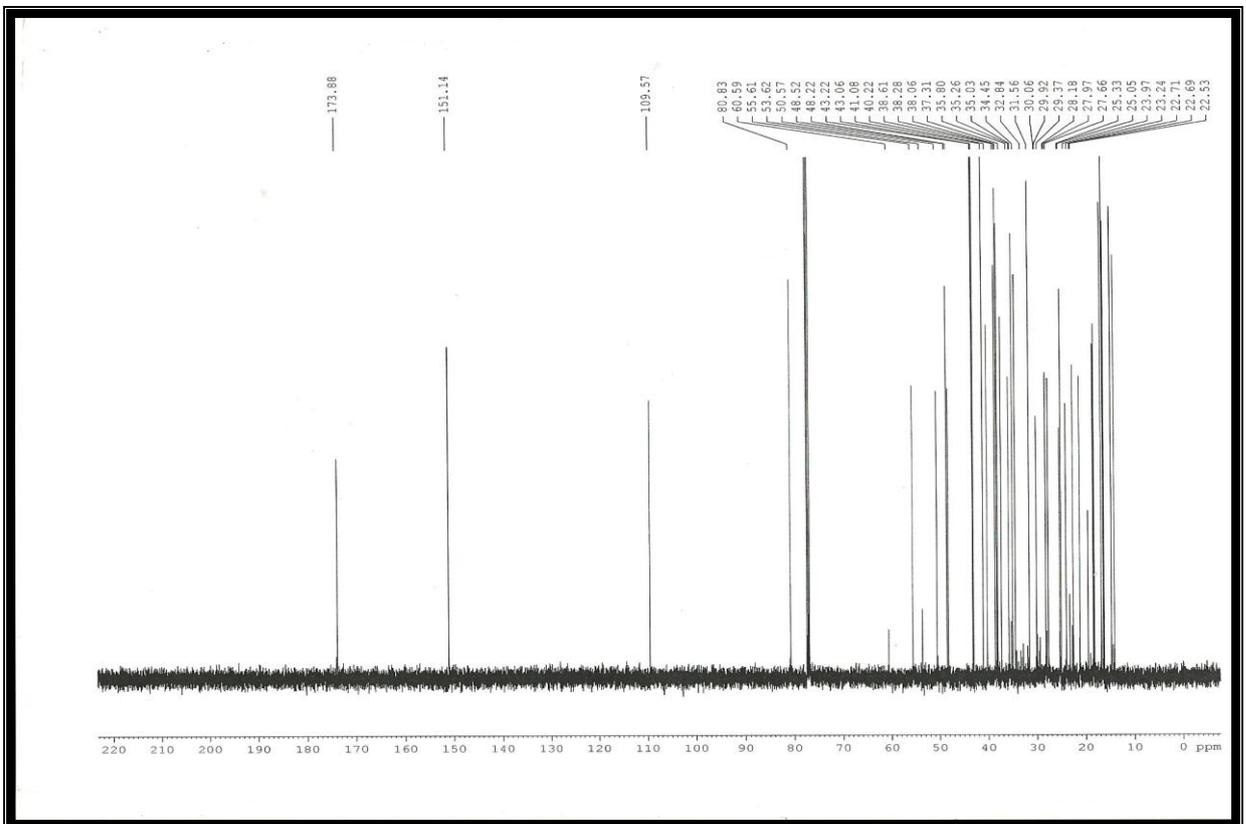
Figura 13 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-2Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-2

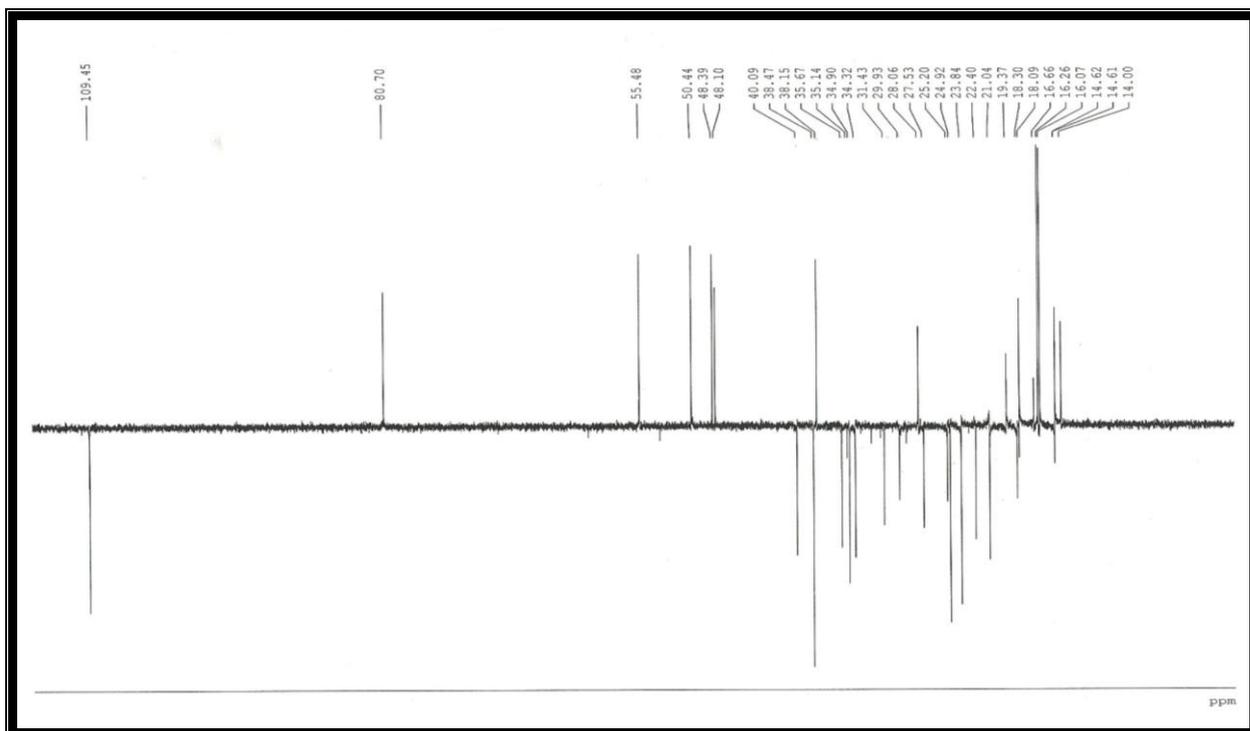
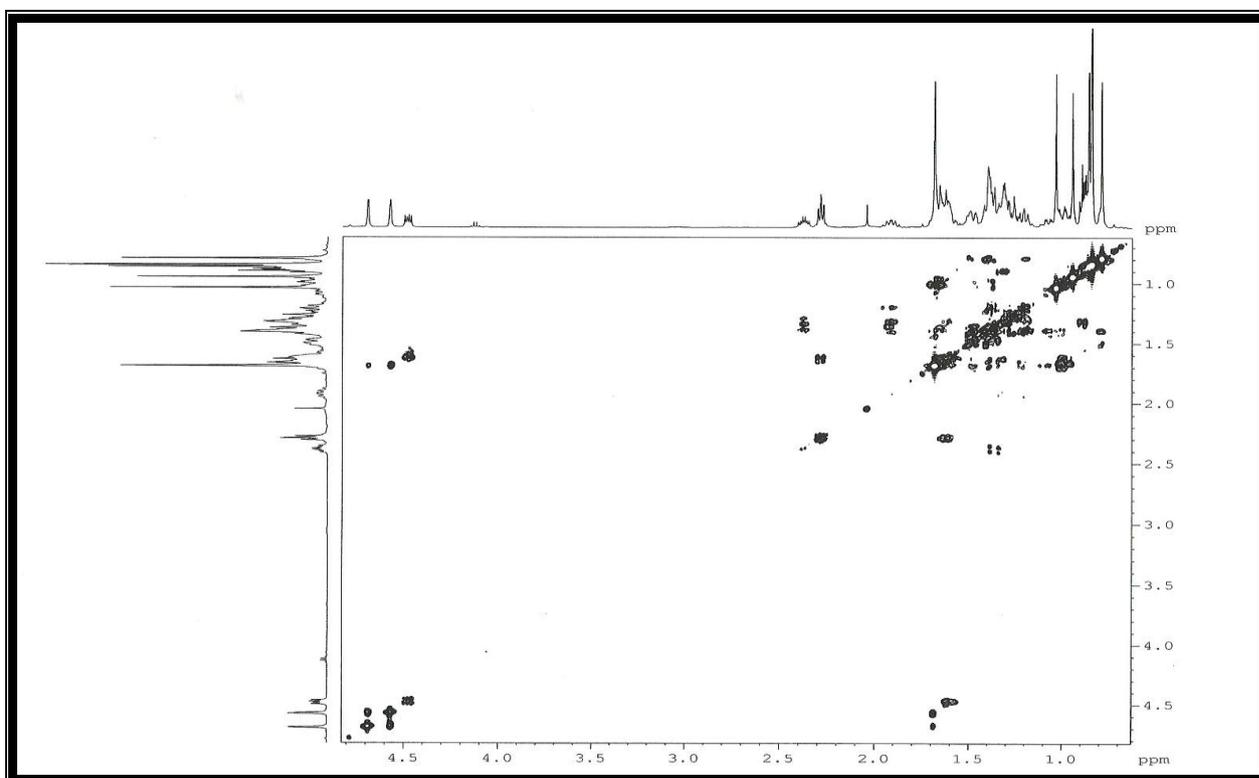
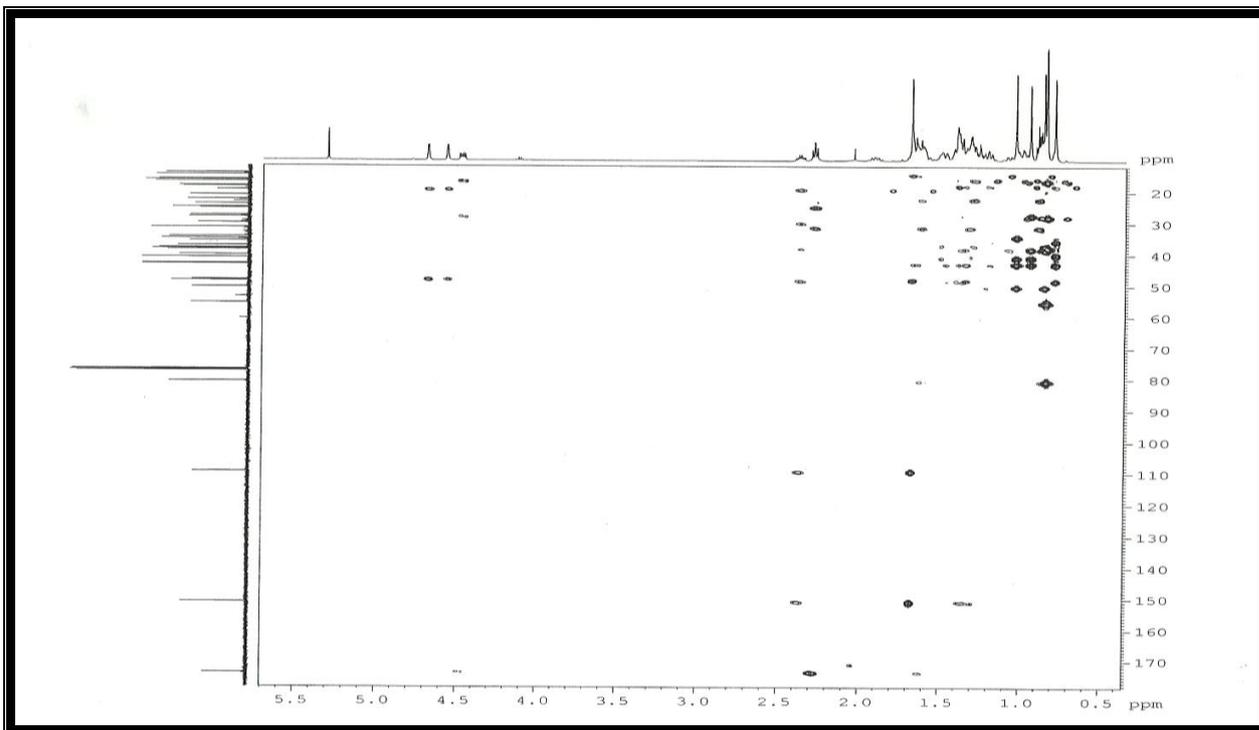
Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-2Figura 16 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – ^1H COSY [500 MHz, CDCl_3] de CCF-2

Figura 17 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-2



4.1.3 Determinação Estrutural CCF-3

Após o tratamento cromatográfico da fração hexano (EHCCFH) do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidioscolus phyllacanthus* permitiu o isolamento de 119 mg de um sólido branco, solúvel em diclorometano, que foi denominado CCF-3 (Figura 21, p. 40).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 22, p. 42) apresentou bandas de absorções de deformação axial de ligação C-H de alifático entre 2938 a 2864 cm^{-1} , uma banda em 1706 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster conjugada, absorção em 1450 referente à deformação axial de ligação C=C de anel aromático, absorções em 1641 cm^{-1} referentes à deformação axial de ligação C=C de olefínico, além de absorção de deformação axial de ligação C–O em 1007 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 25, p. 43) exibiu uma série de sinais característicos de um éster do lupeol, muitos dos quais apareceram em duplicata, levando a crer que CCF-3 tratava-se de uma mistura de compostos. Havia a presença de sinais com absorções entre δ_c 126,2 a δ_c 140,7 que caracterizavam a presença de anel aromático na mistura e sinais em δ_c 119,1 e δ_c 144,4 referentes a carbono olefínico presente em uma das

substâncias dessa mistura. A confirmação dos carbonos foi feita a partir de uma análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 26, p. 44).

O espectro de massa de alta resolução de CCF-3 obtido através da ionização por eletrospray (ESI) (Fig. 23, p. 42) no modo positivo forneceu o pico correspondente ao íon molecular em m/z 579,4203 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, confirmando a fórmula molecular do composto $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_2$ (CCF-3 A) e forneceu também o pico correspondente ao íon molecular em m/z 581,4349 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, confirmando a fórmula molecular do composto $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_2$ (CCF-3 B).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 24, p. 43) revelou absorções semelhantes às de CCF-2, apresentando sinais em δ_{H} 4,63 e δ_{H} 4,49 referentes a hidrogênio ligado a carbono carbinólico de CCF-3 A e CCF-3 B, respectivamente, sinais múltiplos na região δ_{H} 7,20 a δ_{H} 7,54 de hidrogênios ligados a anel aromático, e ainda dois dubletos em δ_{H} 6,45 e δ_{H} 7,67 característicos de hidrogênio de dupla ligação conjugada com carbonila referentes à CCF-3 A. De acordo com os dados apresentados pelos espectros, foi possível identificar que a substância isolada trata-se da mistura dos triterpenos cinamato de lupeol (CCF-3 A) e dihidrocinaurato de lupeol (CCF-3 B) e na proporção de 48,2 % e 51,8% (referentes ao H-3), respectivamente. As percentagens aproximadas dos dois componentes da mistura foram calculadas através da integração dos sinais de hidrogênios.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Fig. 27, p. 44) de CCF-3 mostrou acoplamento vicinal entre os átomos de hidrogênios metínicos em δ_{H} 7,67 (d, $J = 16$ Hz, H-8') com δ_{H} 6,45 (d, $J = 16$ Hz, H-7') referente a um fragmento de CCF-3 A (Figura 18), diferente do acoplamento vicinal entre os átomos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,96 (t, $J = 7,1$ Hz, H-8') com δ_{H} 2,64 (t, $J = 7,1$ Hz, H-7'), referente a um fragmento de CCF-3 B (Fig. 19) confirmando, assim, a presença de uma mistura.

Figura 18 - Subestrutura de CCF-3 A

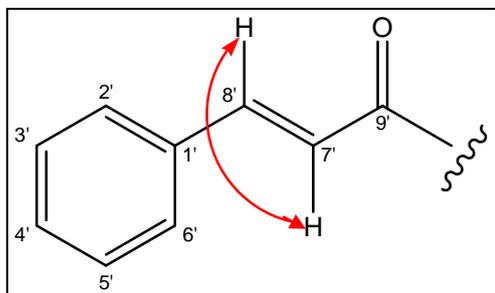
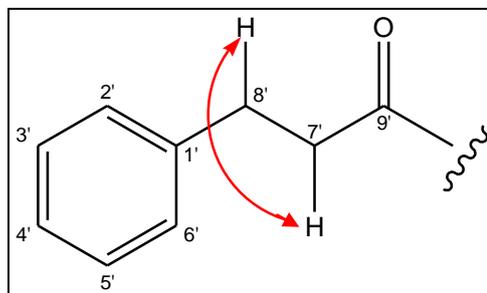


Figura 19 - Subestrutura de CCF-3 B

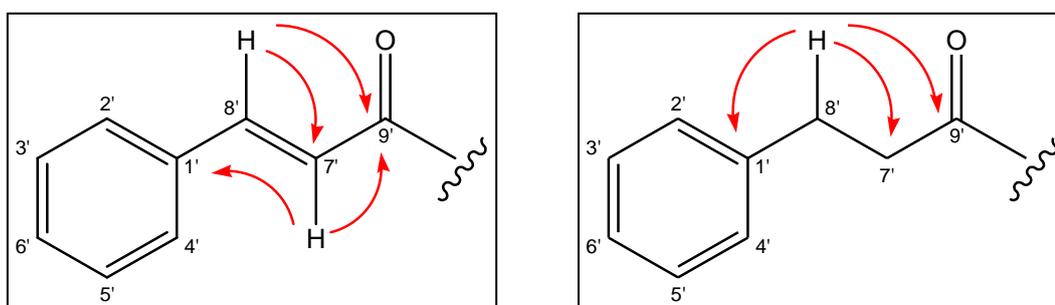


O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 28, p. 45) possibilitou a correlação de

cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono como observado na Tabela 5, (p. 41).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 30, p. 46) possibilitou correlacionar os sinais de hidrogênios e carbonos a duas ($^2J_{CH}$) e a três ligações ($^3J_{CH}$) (Figura 20) e também determinar a estrutura final do triterpeno. A estrutura CCF-3 A foi confirmada pelas correlações do hidrogênio em δ_H 7,67 (d, $J=16$ Hz) (H-8') com os carbonos em δ_C 119,1 (C-7') e δ_C 167 (C-9') e do hidrogênio em δ_H 6,45 (d, $J=16$ Hz) (H-7') com os carbonos em δ_C 143,7 (C-1') e δ_C 167 (C-9'). (Fig. 20). A estrutura CCF-3 B foi confirmada pelas correlações do hidrogênio em δ_H 2,64 (t, $J=7,1$ Hz) (H-8') com os carbonos em δ_C 140,7 (C-1'), δ_C 31,3 (C-7') e δ_C 172,8 (C-9'). (Fig.20). Os dados obtidos encontram-se listados na Tabela 5 (p. 41).

Figura 20 - Subestruturas de CCF-3 A e CCF-3 B



Com base na discussão exposta e através da análise comparativa com dados descritos na literatura (BRUM et al., 1997), chegou-se à conclusão que CCF-3 trata-se de uma mistura de éster de triterpeno com esqueleto lupano cinamato de lupeol (CCF-3 A) e dihidrocinaurato de lupeol (CCF-3 B) (Figura 21), nas proporções de 51,8% e 48,2% (referentes ao H-3), respectivamente. As percentagens aproximadas dos dois componentes da mistura foram calculadas através da integração dos sinais de hidrogênios.

Figura 21 - Estrutura de CCF-3 A e CCF-3 B

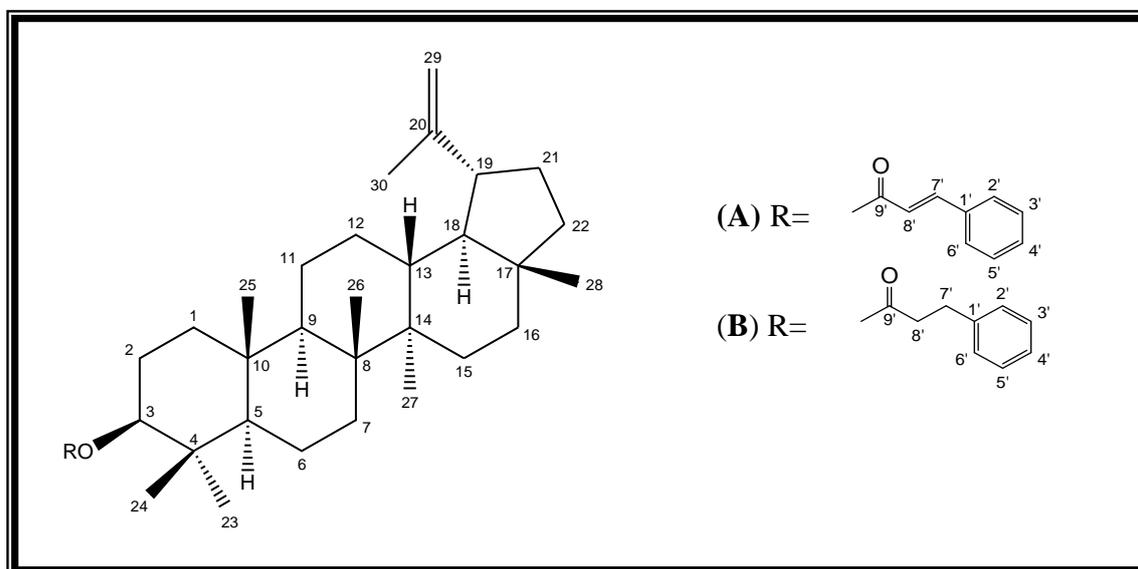


Tabela 5 - Dados espectrais de RMN ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz) de CCF-3 A e CCF-3 B, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl₃. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_H) e de carbono-13 (δ_C) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.

	CCF-3 A				CCF-3 B				
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC		*CL/DL
	δ_C	δ_H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ_C	δ_H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ_C
C									
4	37,8	-			37,9	-	3H-23; 3H-24		37,9
8	41,9	-			41,9	-	3H-26	3H-27	40,9
10	37,2	-			37,3	-	3H-27	3H-26	37,1
14	43,2	-			43,1	-	3H-25		42,3
17	43,0	-			43,0	-	3H-28		43,0
20	151,1	-			151,1	-	H-19; 3H-30	H-18	150,9
1'	134,7	-	H-8'	H-3'/5'	140,7	-	2H-8'	2H-7'	134,6/140,6
9'	167,0	-	H-7'	H-8'	172,8	-	2H-7'	2H-8'	166,8/172,7
CH									
3	81,1	4,63 (dd, 10,6, 5,2)			81,1	4,49 (dd, 10,6, 5,6)		3H-23; 3H-24	81,0
5	55,5	0,86			55,5	0,86		3H-23; 3H-24; 3H-25	55,4/55,5
9	50,4	1,30			50,4	1,30		3H-25; 3H-26	50,4
13	38,1	1,65			38,1	1,65		3H-27	38,1
18	43,3	1,38			43,3	1,38	H-19	3H-28	48,3
19	48,1	2,73 (m)			48,1	2,73 (m)		-3H-30	48,0
7'	119,0	6,45 (d, 16)			-	-			144,3/31,1
8'	144,4	7,67 (d, 16)	H-7'		-	-			118,9/36,2
2'/6'	128,1	7,94 (m)			126,2	7,20 (m)			128,3/128,0
3'/5'	128,9	7,36 (m)			128,5	7,28 (t, 7,4)			128,5/128,9
4'	130,9	7,36 (m)	H-2'/6'		128,3	7,22 (m)			130,1/126,2
CH₂									
1	38,5	1,76, 1,05			38,4	1,76, 1,05		3H-25	38,4
2	23,9	1,60; 1,55			23,7	1,60; 1,55			23,7/23,9
6	18,3	1,50, 1,30			18,1	1,50, 1,30			18,2
7	34,2	1,45			34,4	1,45		3H-26	34,0
11	21,0	1,40, 1,25			21,0	1,40, 1,25			20,9
12	25,2	1,62, 1,10			25,2	1,62, 1,10			25,1
15	27,6	1,63, 1,02			27,6	1,63, 1,02		3H-27	27,5
16	35,7	1,50, 1,43			35,3	1,50, 1,43		3H-28	35,6
21	29,9	1,92 (m), 1,30			29,9	1,92 (m), 1,30			29,9
22	40,1	1,40, 1,20			40,1	1,40, 1,20		3H-28	40,0
29	109,5	4,70 (s), 4,58 (s)			109,5	4,70 (s), 4,58 (s)		H-19; 3H-30	109,4
7'	-	-			31,2	2,64 (t, 7,1)	2H-8'		144,3/31,1
8'	-	-			36,4	2,96 (t, 7,1)	2H-7'		118,9/36,2
CH₃									
23	28,1	0,79 (s)			27,9	0,91 (s)		3H-24	27,9/28,1
24	16,7	0,94 (s)			16,8	0,82 (s)		3H-23	16,5/16,7
25	16,3	0,90 (s)			16,2	0,85 (s)			16,2
26	16,0	1,04 (s)			16,0	1,06 (s)			16,0
27	14,2	0,95 (s)			14,6	0,97 (s)		2H-15	14,5
28	18,1	0,99 (s)			18,1	0,80 (s)			18,0
30	19,4	1,70 (s)			19,4	1,69 (s)		H-19; 2H-29	19,3

*CL/DL = Cinamato de lupeol/Diidrocinamato de lupeol (BRUM *et al.*, 1997)

Dados espectroscópicos da substância CCF-3

Figura 22 – Espectro na região do infravermelho de CCF-3

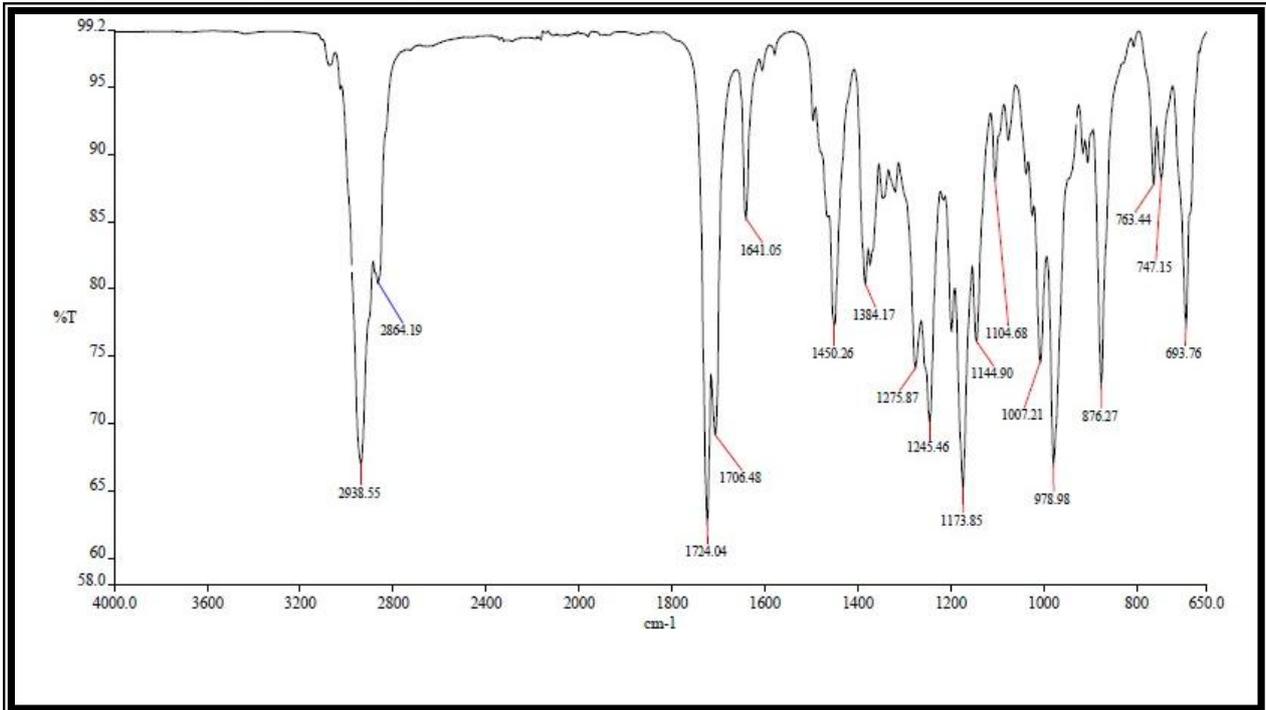


Figura 23 - Espectro de massas (EM-ESI (+)) de CCF-3

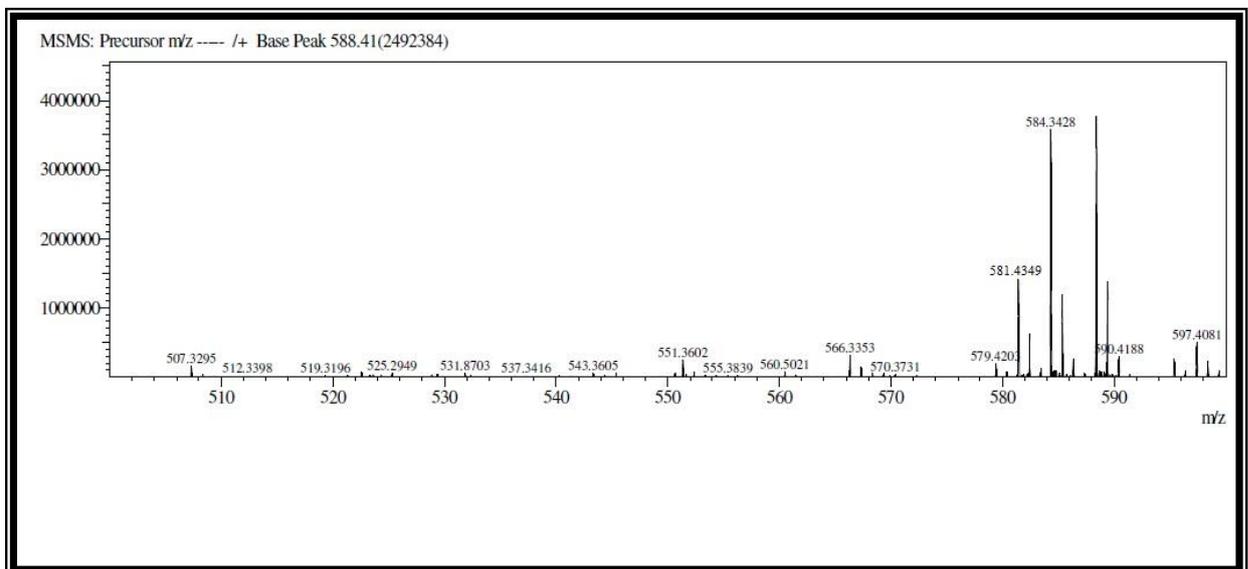


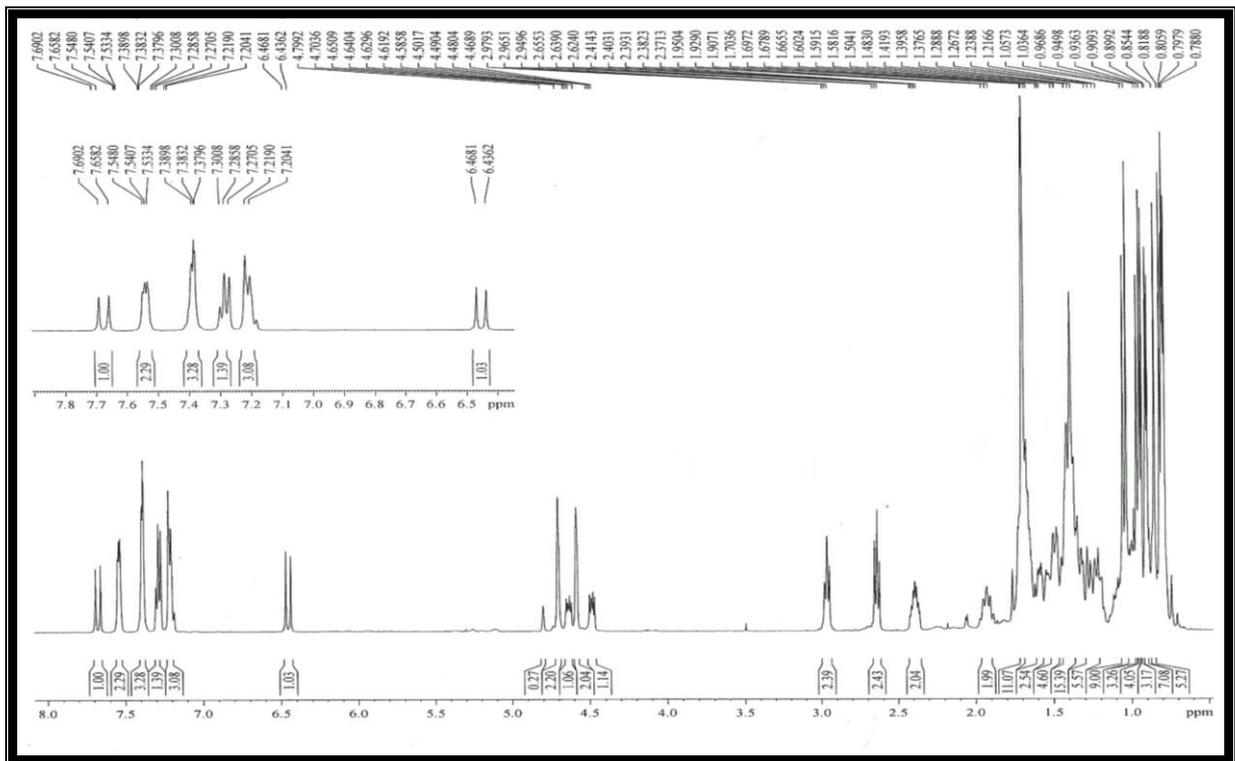
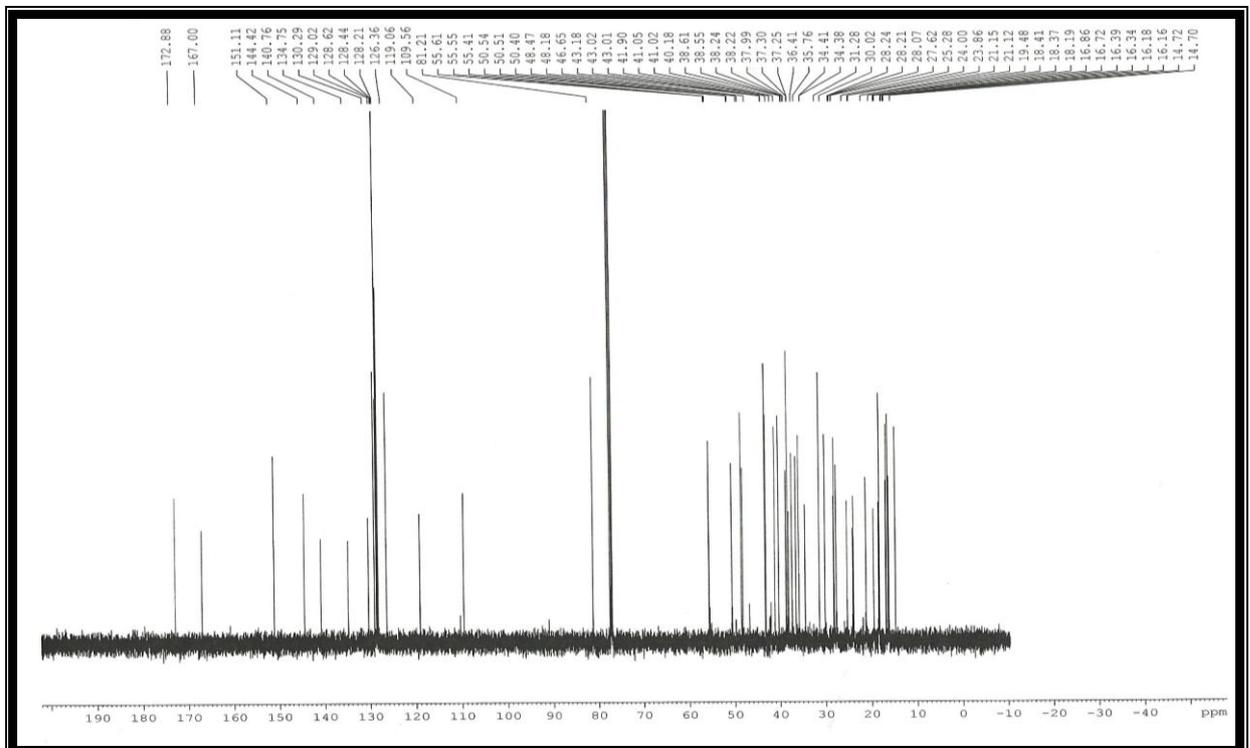
Figura 24 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-3Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-3

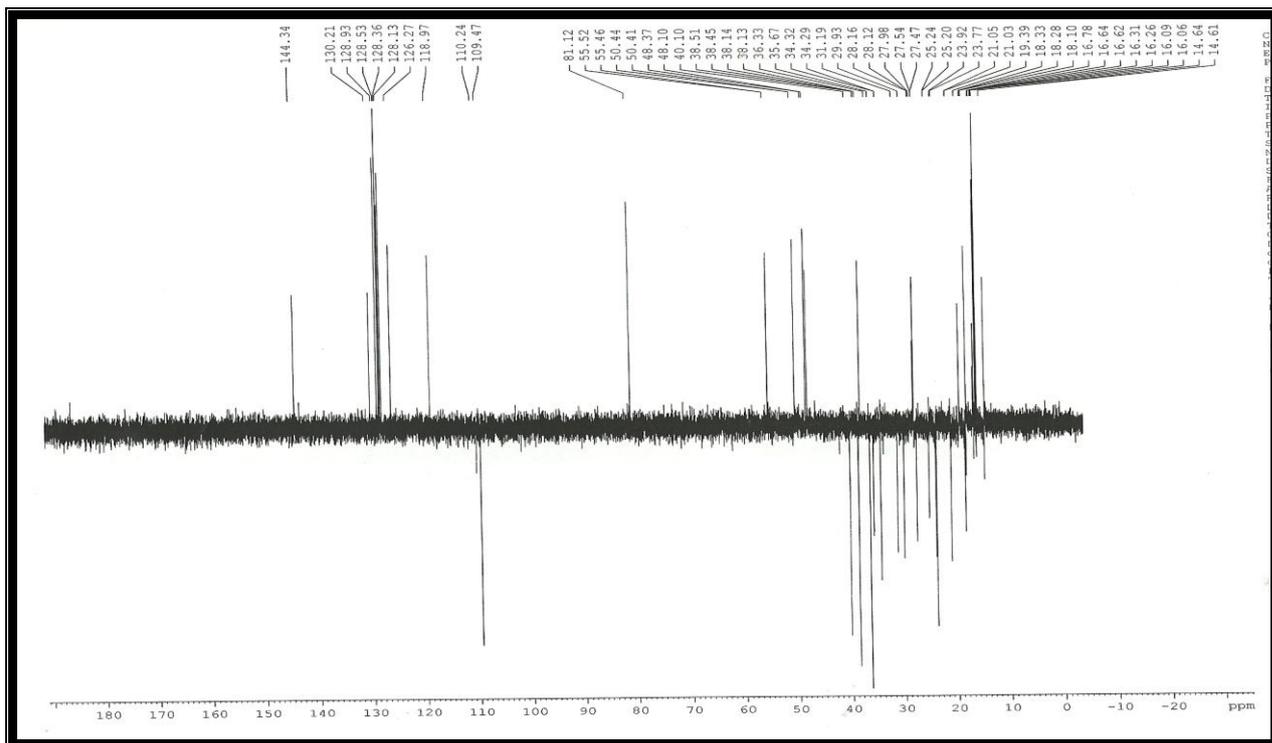
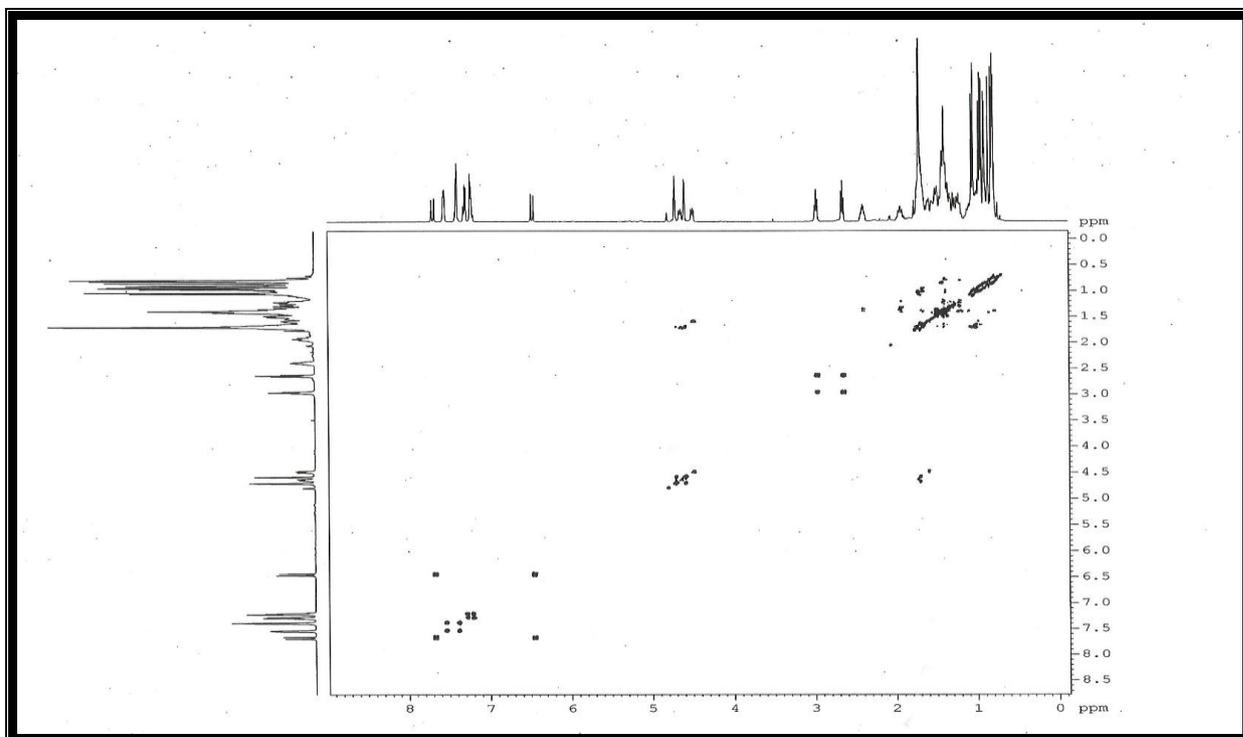
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-3Figura 27 - Espectro de RMN ^1H , $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY [500 MHz, CDCl_3] de CCF-3

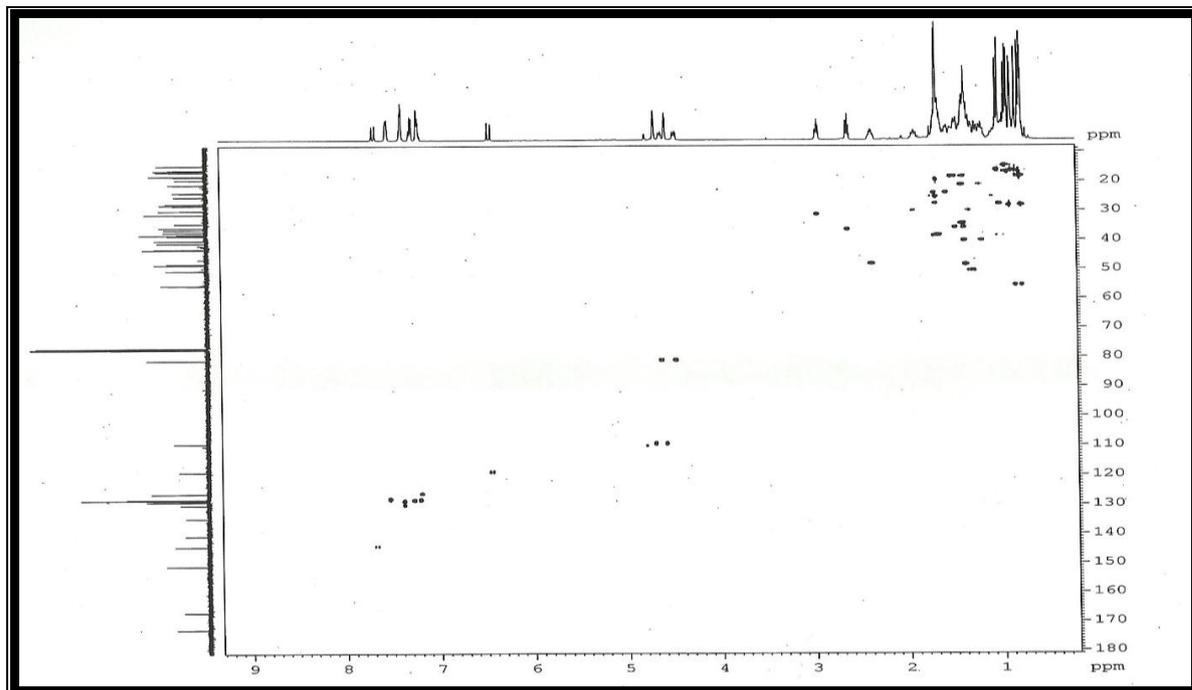
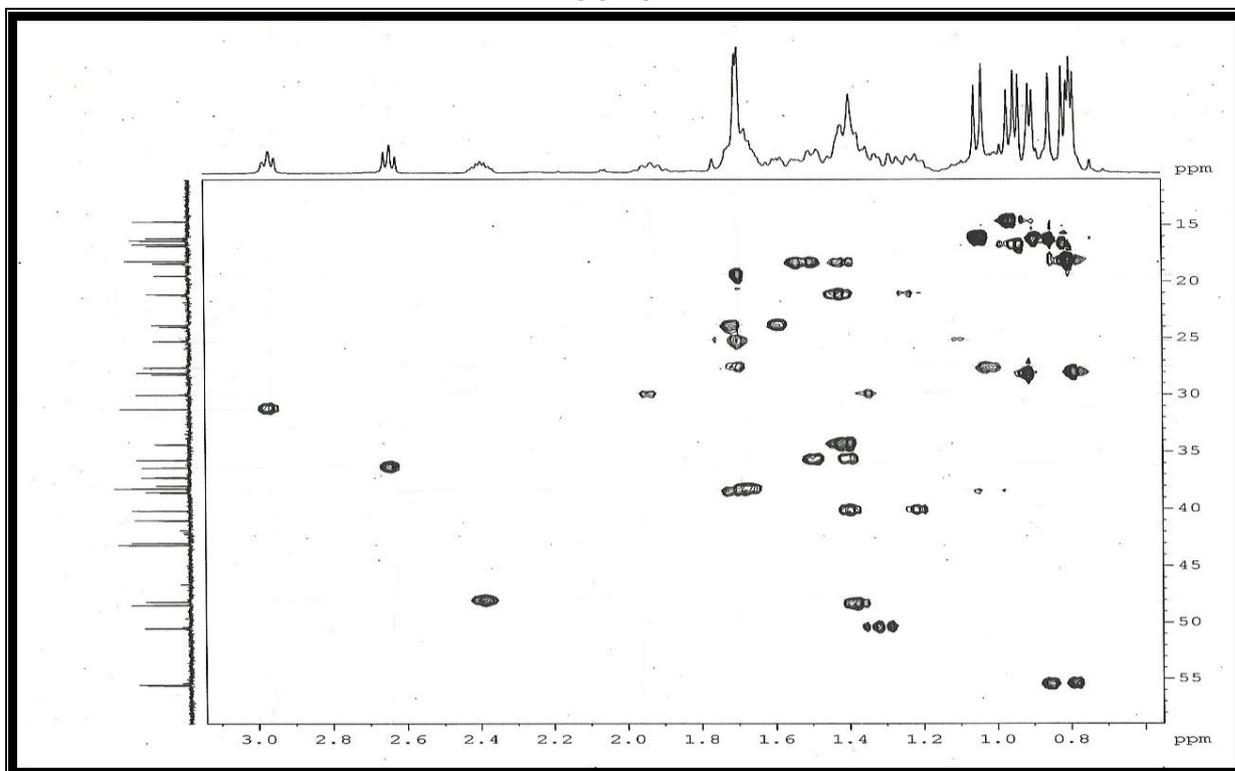
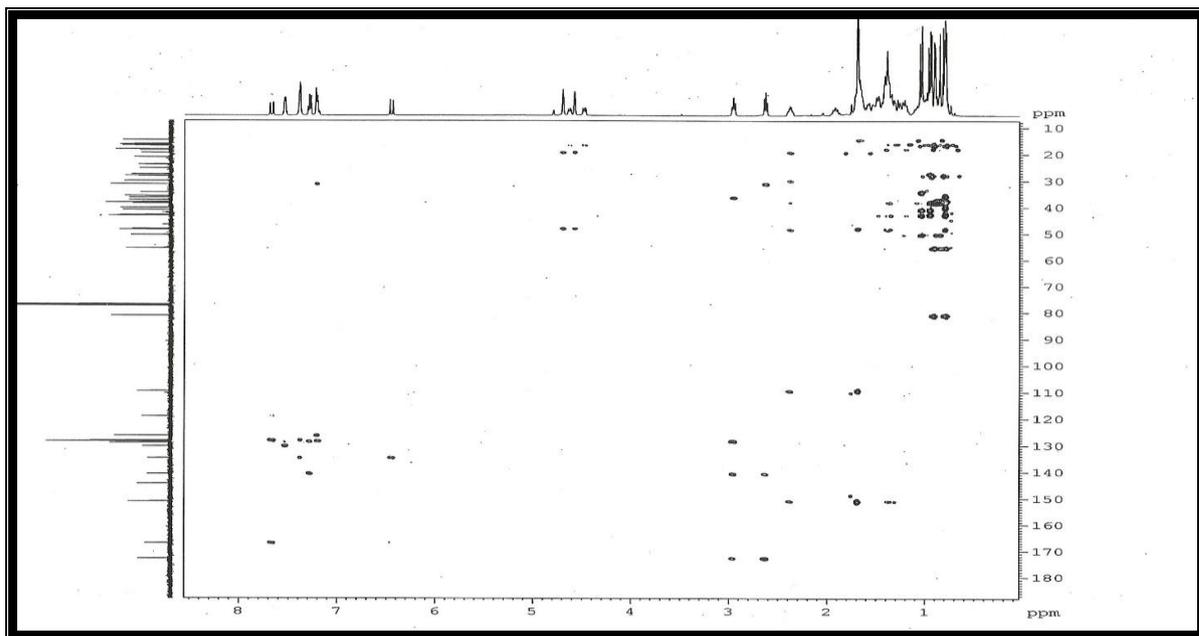
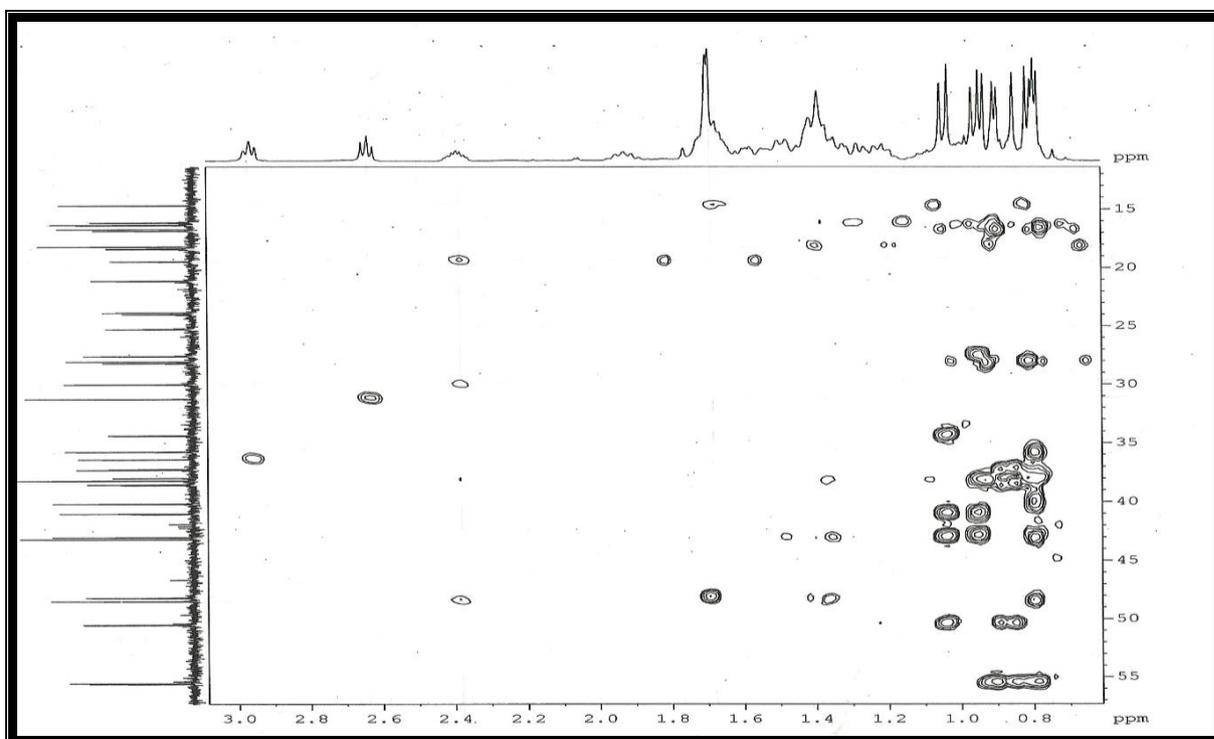
Figura 28 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3Figura 29 - Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3

Figura 30 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3Figura 31 - Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CCF-3

4.1.4 Determinação Estrutural CCF-4

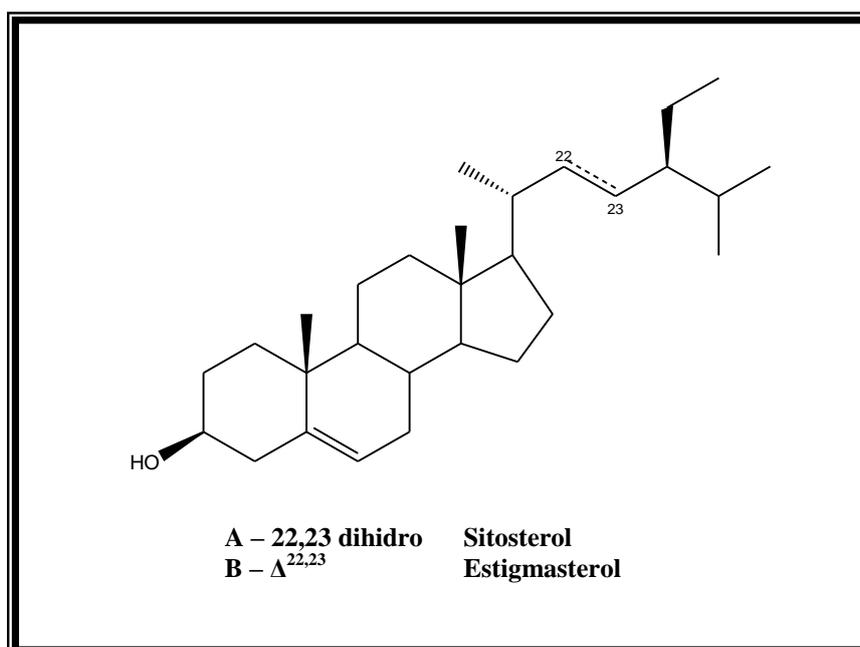
Do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (EHCCFD) do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidioscolus phyllacanthus* foi possível isolar 10 mg de um sólido branco, em forma de agulha, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão na faixa de 132-134 °C que foi denominado CCF-4 (Fig. 32).

A partir da análise do espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 34, p. 48) e do espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Fig. 35, p. 49) observou-se, na região de carbonos olefínicos, a presença de um carbono não-hidrogenado em δ_{C} 140,9 e três carbonos metínicos δ_{C} 121,9; δ_{C} 138,5 e δ_{C} 129,5, assim como uma absorção em δ_{C} 72,0, característica de carbono metínico oxigenado.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 33, p. 48) indicava sinais característicos de esteroides onde revelou os sinais em δ_{H} 5,36; δ_{H} 5,17; δ_{H} 5,03 relativos a átomos de hidrogênios olefínicos, sinal em δ_{H} 3,54 referente ao hidrogênio carbinólico e o acúmulo de sinais na região de δ_{H} 0,60 a δ_{H} 2,40 referente aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

Com base na discussão exposta e através da análise comparativa com dados descritos na literatura (KROGH, 2001), chegou-se à conclusão que CCF-4 trata-se de uma mistura dos esteroides sitosterol (CCF-4 A) (Fig. 32) com o estigmasterol (CCF-4 B) (Fig. 32).

Figura 32 - Estrutura de CCF-4 A e CCF-4 B



Dados espectroscópicos da substância CCF-4

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CCF-4

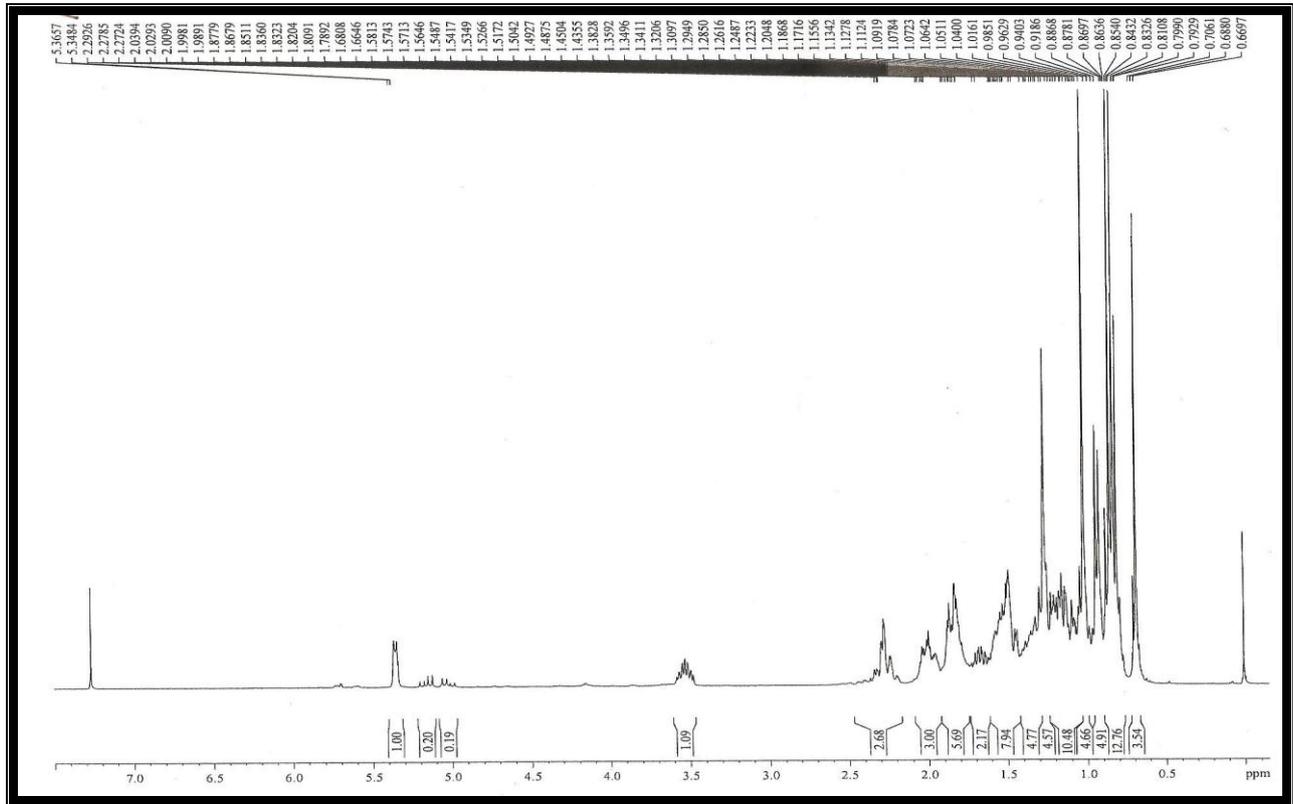


Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CCF-4

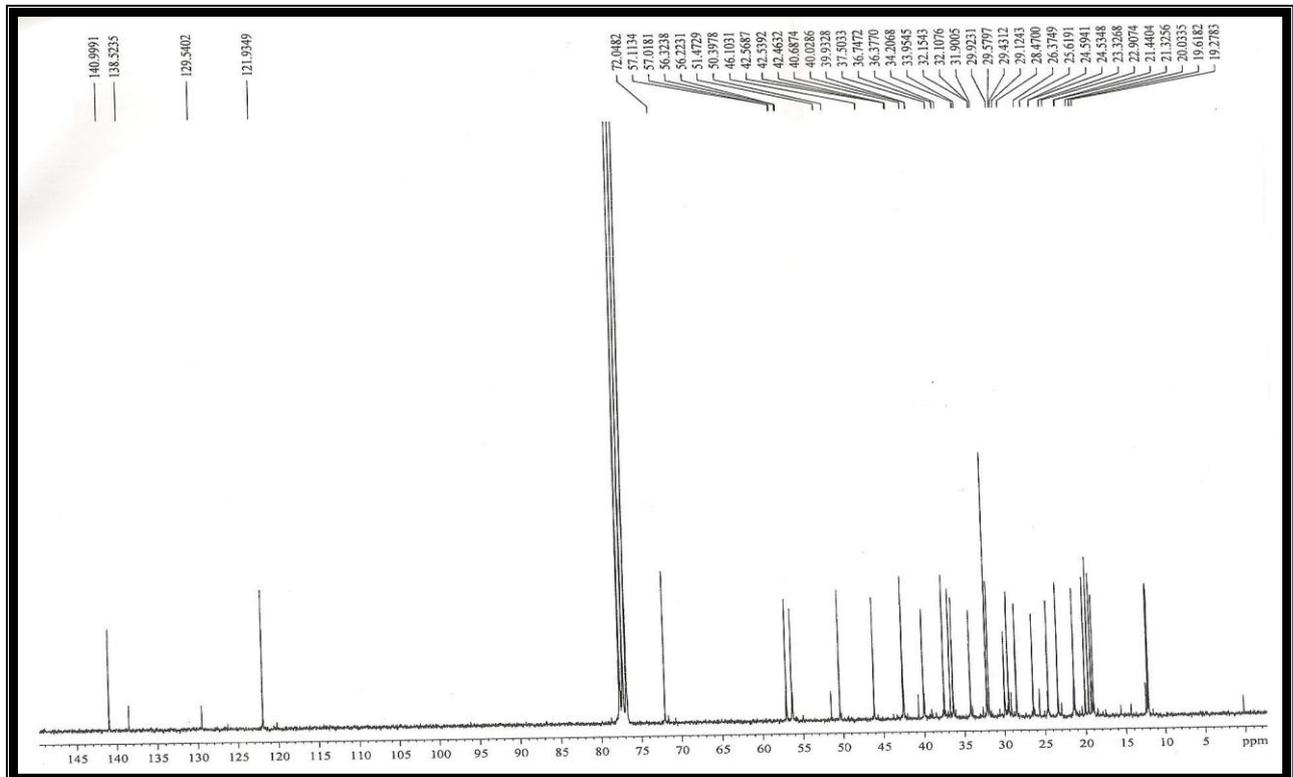
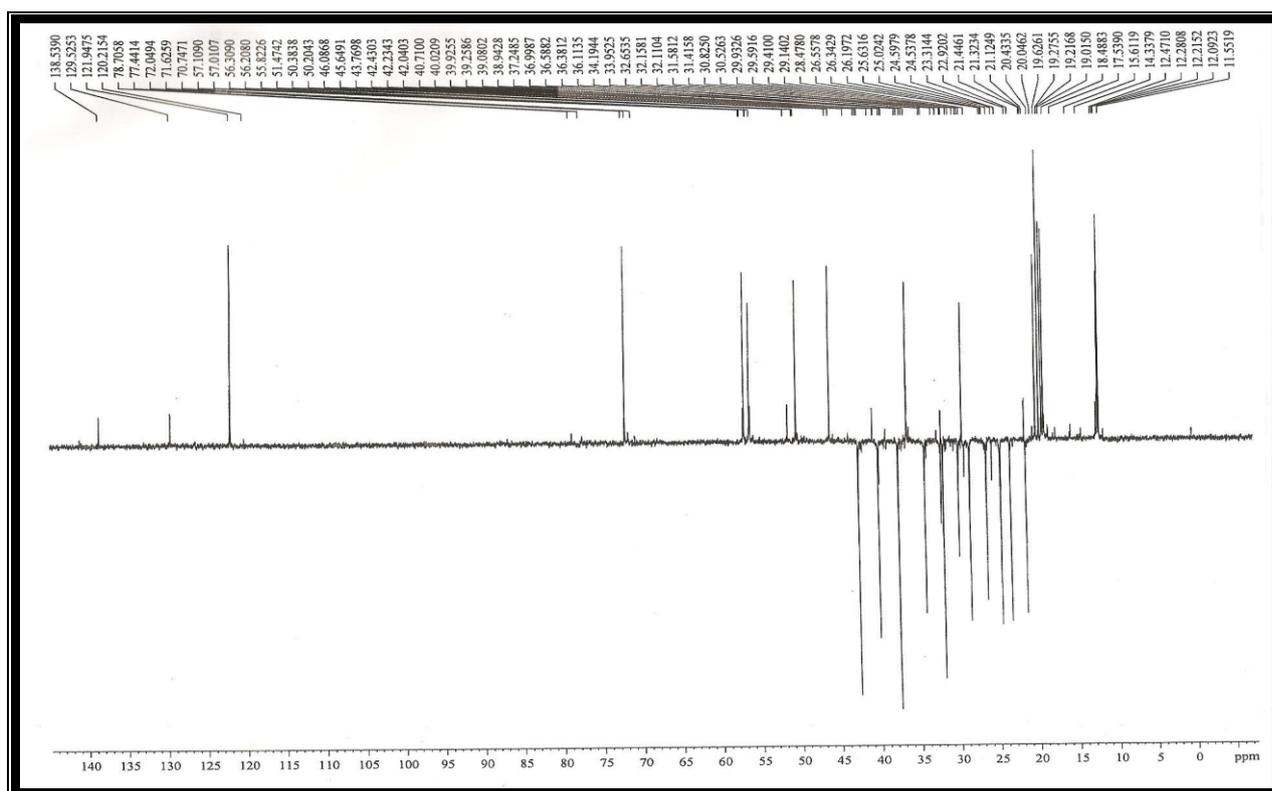


Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CCF-4



4.1.5 Determinação Estrutural CCF-5

O fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (EECCFD) do extrato etanólico da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* forneceu 90 mg de um sólido branco, solúvel em diclorometano, com ponto de fusão na faixa de 149-151 °C que foi denominado CCF-5 (Fig. 38, p. 51).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 39, p. 52) revelou bandas de absorções de deformação axial de ligação C-H de alifático entre 2925 a 2863 cm^{-1} , absorção de deformação axial de ligação O-H em 3378 cm^{-1} assim como absorções de δ_{C} 1618, δ_{C} 1583 e δ_{C} 1439 que caracterizavam a presença de anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] (Fig. 42, p. 54) registrou um total de 18 linhas espectrais, sendo dois sinais em δ_{C} 124,9 e δ_{C} 145,2 referentes a carbonos olefinicos, a presença de absorções em δ_{C} 151,7 referente a carbono sp^2 oxigenado e sinais entre δ_{C} 116,9 e δ_{C} 151,7 que caracterizam a presença de anel aromático. Após análise e comparação com os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 43, p. 54), verificou-se a presença de 4 carbonos metínicos (CH), 5 carbonos metilênicos (CH_2), 3 carbonos metílicos (CH_3) e 6

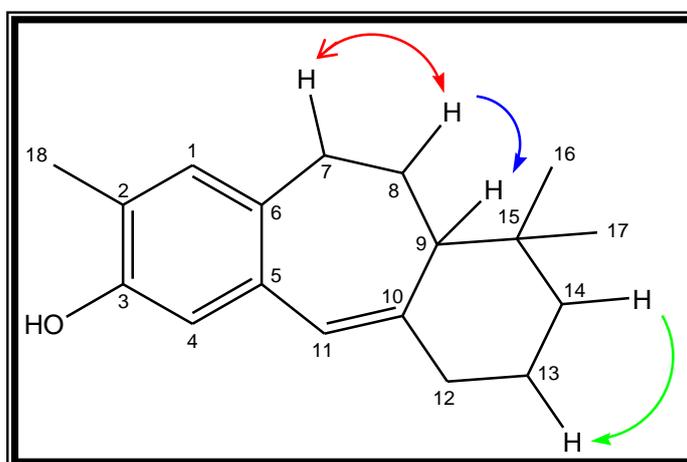
carbonos não hidrogenados (C). Os dados de RMN ^{13}C para CCF-5, estão interpretados na Tabela 6 (p. 52).

O espectro de massas (Fig. 40, p. 53) obtido apresentou o pico do íon molecular com m/z 256 Daltons, possibilitando confirmação da fórmula molecular do composto $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$.

A análise do espectro de RMN ^1H (Fig. 42, p. 53) permitiu identificar sinais de hidrogênios de metila em δ_{H} 0,72 (s); δ_{H} 1,00 (s) e δ_{H} 2,21. Um singlete em δ_{H} 6,26 atribuído a hidrogênio de um grupo vinílico (H-11) e outros dois em δ_{H} 6,8 e δ_{H} 6,6 referente a hidrogênio de anel aromático. Sinais em δ_{H} 2,27 (m) e δ_{H} 2,38 (m) característicos de hidrogênio ligado a carbono alílico.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Fig. 44, p. 55) de CCF-5 mostrou acoplamento vicinal entre os átomos de hidrogênio metilênicos em δ_{H} 2,59 (m, H-7) com δ_{H} 1,48 (m, H-8), outro acoplamento vicinal entre os átomos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,48 (m, H-8) com átomos de hidrogênios metínicos em δ_{H} 2,27 (m, H-9) e acoplamento vicinal entre os átomos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,64 (m, H-13) com δ_{H} 1,40 (m, H-14).

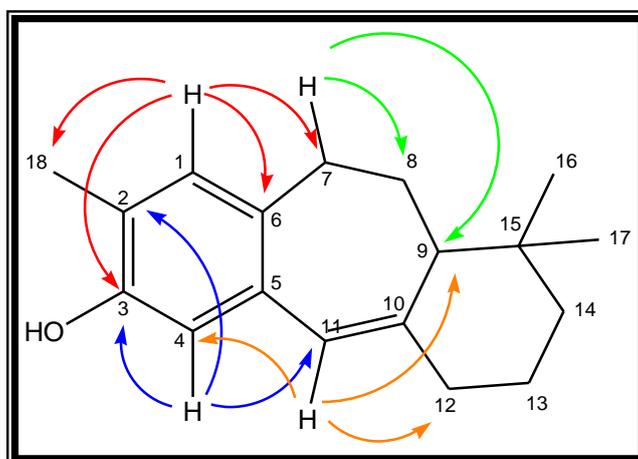
Figura 36 - Estrutura 1 de CCF-5



O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 45, p. 55) possibilitou a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono como observado na Tabela 6, (p. 52).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 46, p. 56) possibilitou correlacionar os sinais de hidrogênios e carbonos a duas ($^2J_{CH}$) e a três ligações ($^3J_{CH}$) (Figura 37) e também determinar a estrutura final do bis-nor-diterpeno isolado. A estrutura CCF-5 foi confirmada pelas correlações do hidrogênio em δ_H 6,78 (s) (H-1) com os carbonos em δ_C 151,7 (C-3), δ_C 153,4 (C-6), δ_C 32,8 (C-7) e δ_C 15,4 (C-18), do δ_H 6,56 (s) (H-4) com os carbonos em δ_C 121,1 (C-2), δ_C 151,7 (C-3) e δ_C 124,9 (C-11), do δ_H 6,26 (s) (H-11) com os carbonos em δ_C 116,8 (C-4), δ_C 55,1 (C-9) e δ_C 41,3 (C-12) e do δ_H 2,59 (m) (H-7) com os carbonos em δ_C 30,4 (C-8) e δ_C 55,1 (C-9) (Fig. 37). Os dados obtidos encontram-se listados na Tabela 6 (p. 52).

Figura 37 - Estrutura 2 de CCF-5



Baseando-se em todas as informações espectrais obtidas (Tabela 6, p. 52), verificou-se que CCF-5 trata-se de um bis-nor-diterpeno que foi identificado como deoxofavelina, (Fig. 38) já relatado na espécie *Cnidoscopus phyllacanthus* (ENDO; OHTA; NOZOE, 1991a).

Figura 38 - Estrutura de CCF-5

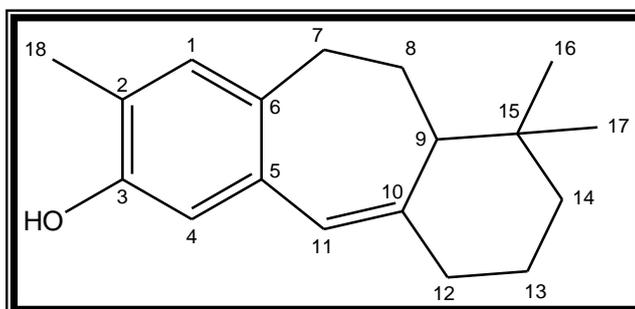


Tabela 6 - Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de CCF-5, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.

	HSQC		HMBC		DF*
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	121,1	-	3H-18	1H-4	120,9
3	151,7	-	1H-4	1H-1;3H-18	151,6
5	135,6	-	-	-	135,4
6	135,4	-	-	-	135,6
10	145,2	-	1H-9	2H-13	145,1
15	36,9	-	3H-16; 3H-17	-	36,7
CH					
1	130,5	6,78 (s)	-	3H-18	130,4
4	116,8	6,56 (s)	-	1H-11	116,6
9	55,1	2,27 (m)	1H-11	2H-7; 2H-14; 3H-16; H-17	54,9
11	124,9	6,26 (s)	-	1H-4	124,7
CH₂					
7	32,8	2,59 (m)	1H-1	-	32,7
8	30,4	1,48 (m)	2H-7	-	30,4
12	41,3	2,38 (m)	-	1H-11	41,2
13	24,6	1,64 (m)	-	-	24,5
14	42,5	1,40 (m)	-	3H-16; 3H-17	42,4
CH₃					
16	20,5	0,72 (s)	-	2H-14; 3H-17	20,4
17	30,5	1,00 (s)	-	2H-14; 3H-16	30,4
18	15,4	2,21 (s)	-	1H-1	15,4

*DF = Deoxofavelina (ENDO; OHTA; NOZOE, 1991a).

Dados espectroscópicos da substância CCF-5

Figura 39 – Espectro na região do infravermelho de CCF-5

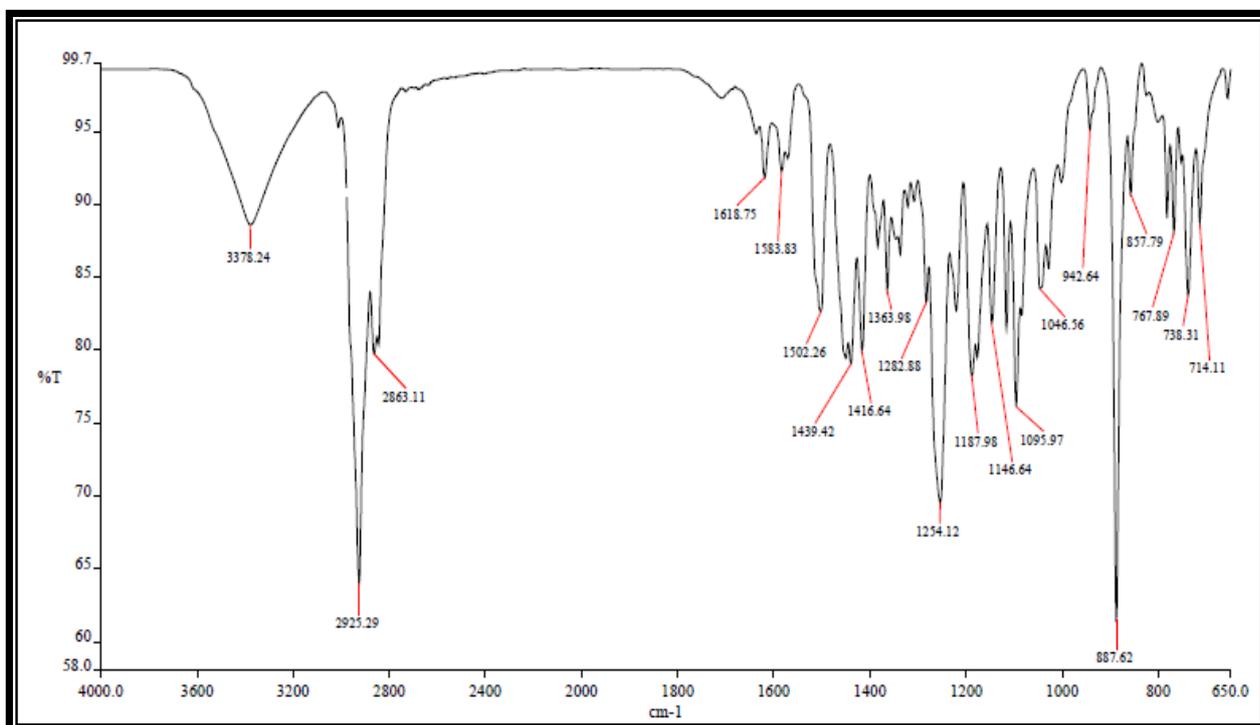


Figura 40 - Espectro de massas (EM-IE) de CCF-5

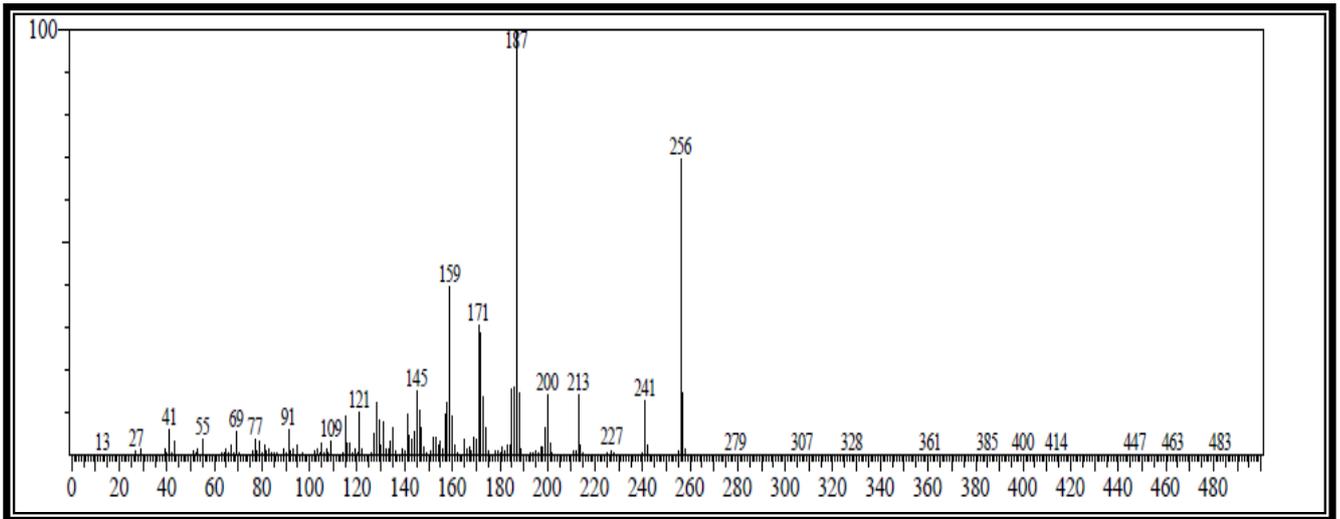
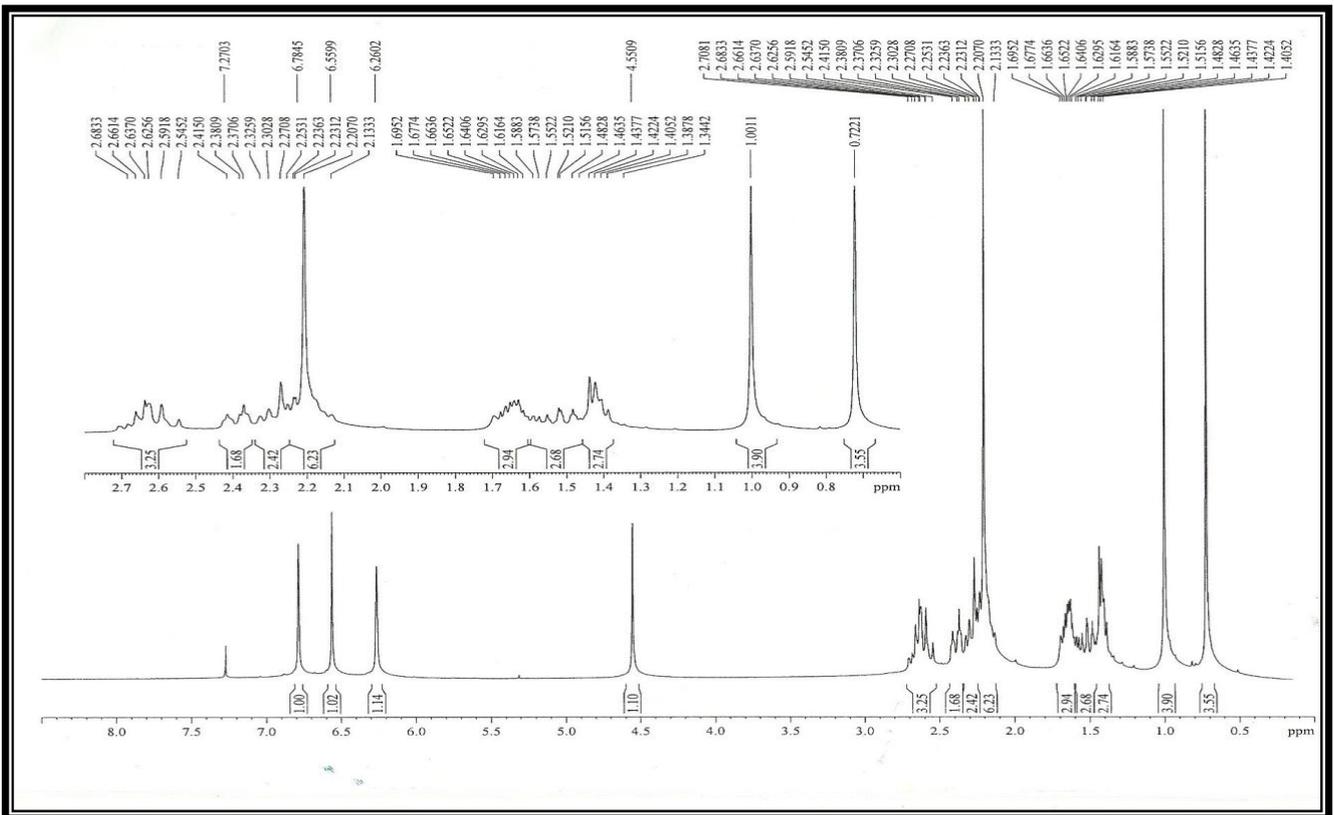
Figura 41 - Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CCF-5

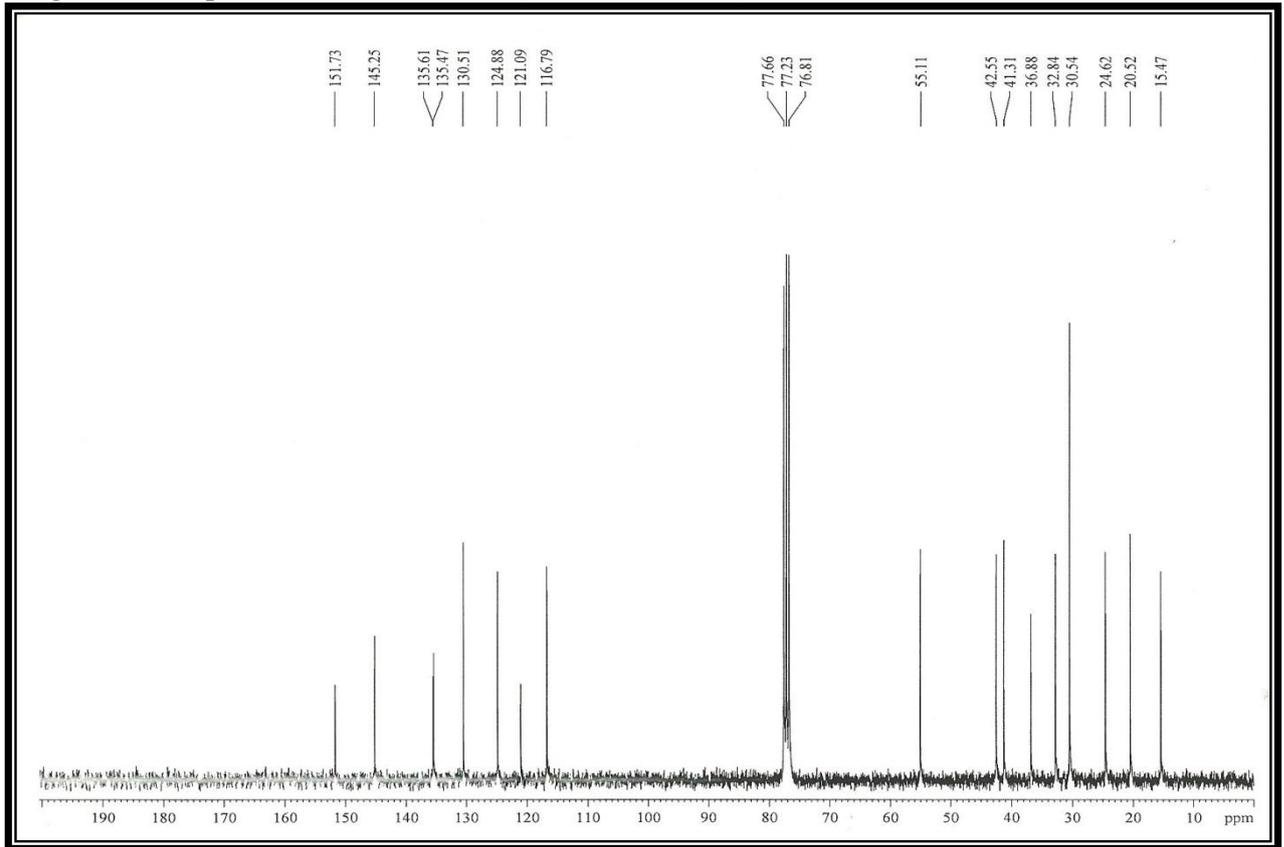
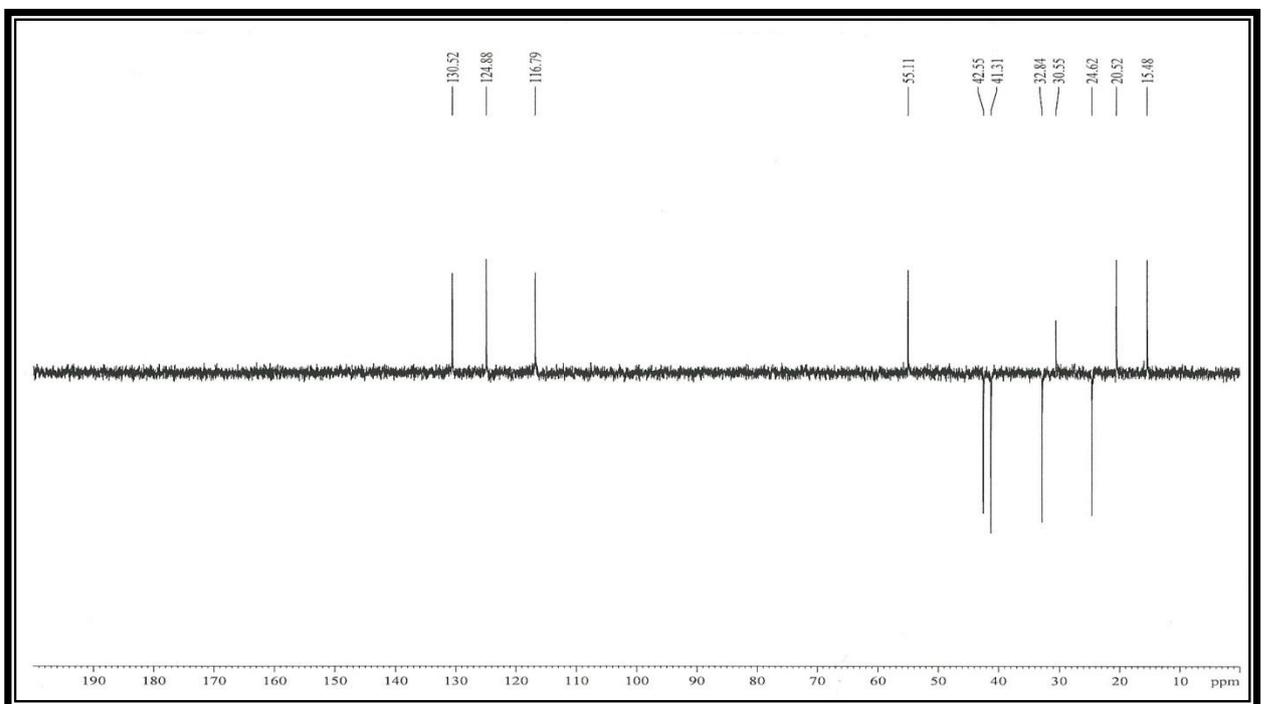
Figura 42 - Espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] de CCF-5Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [75 MHz, CDCl_3] de CCF-5

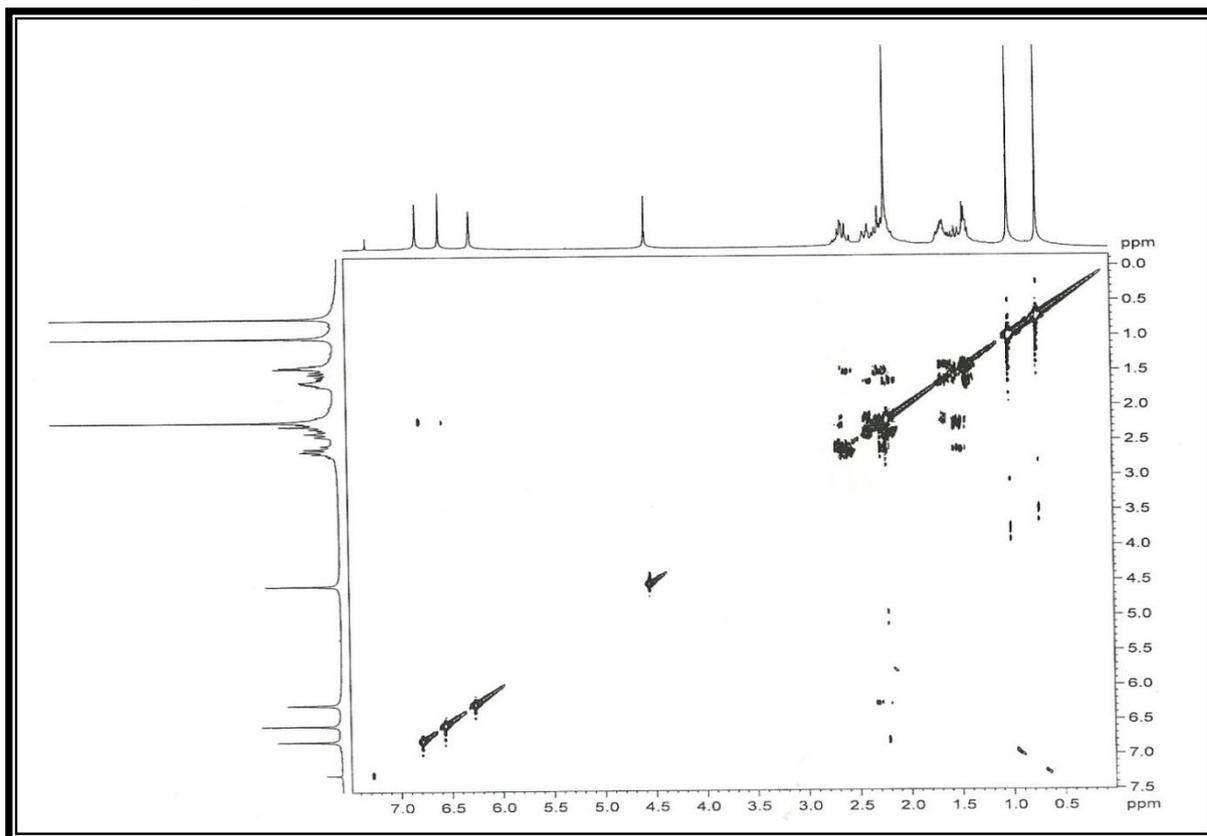
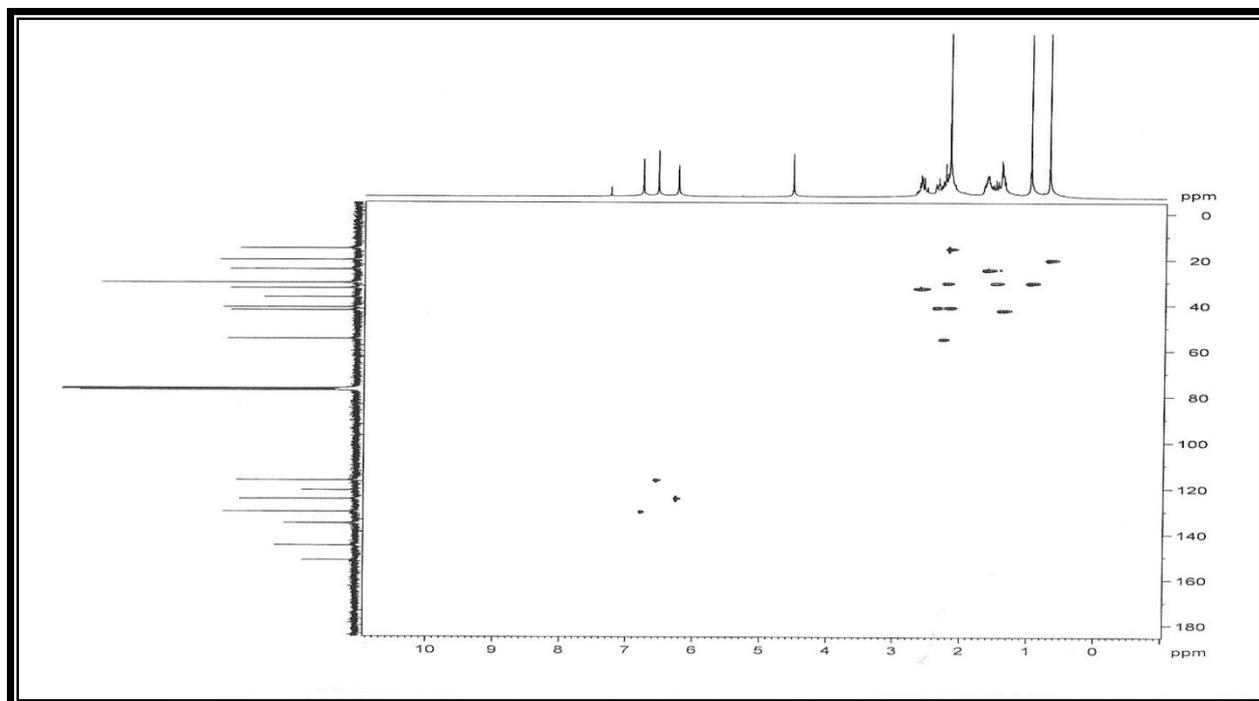
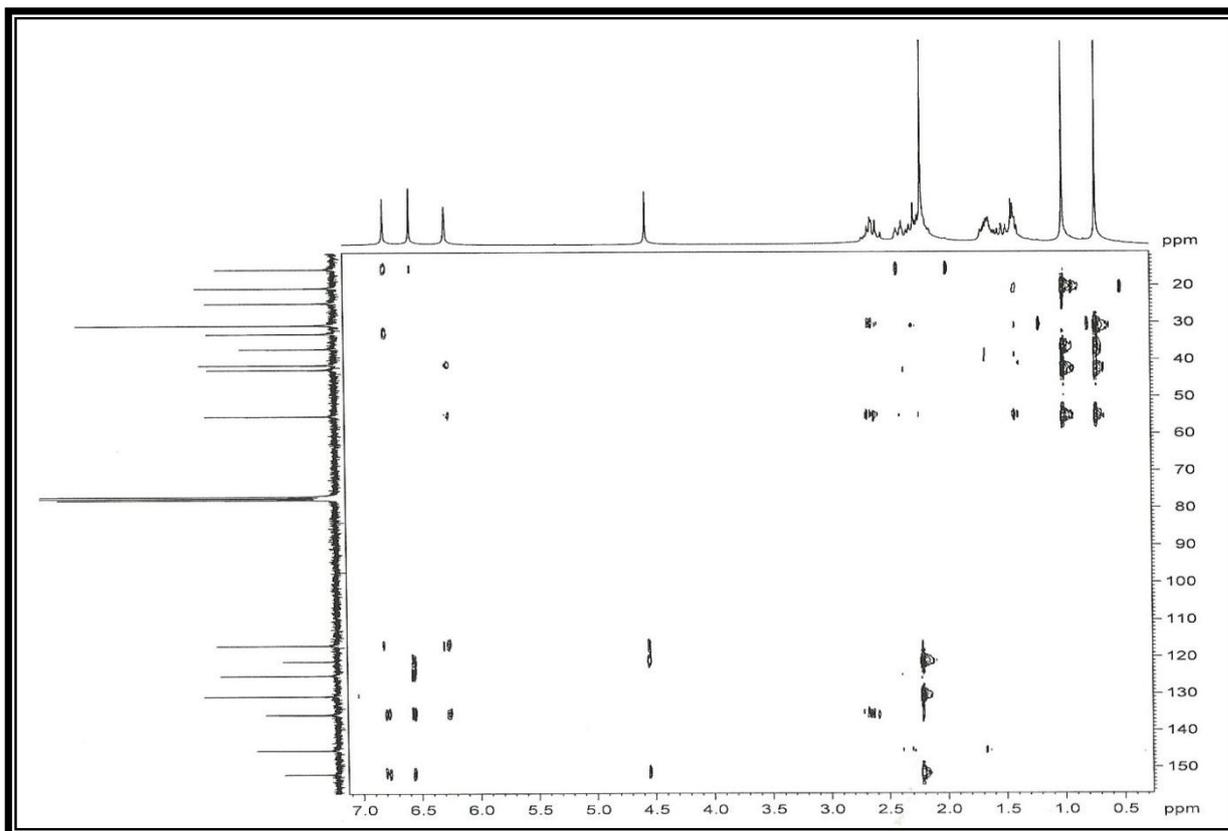
Figura 44 - Espectro de RMN ^1H , $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY [300 MHz, CDCl_3] de CCF-5Figura 45 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HSQC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-5

Figura 46 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-5



4.1.6 Determinação Estrutural CCF-6

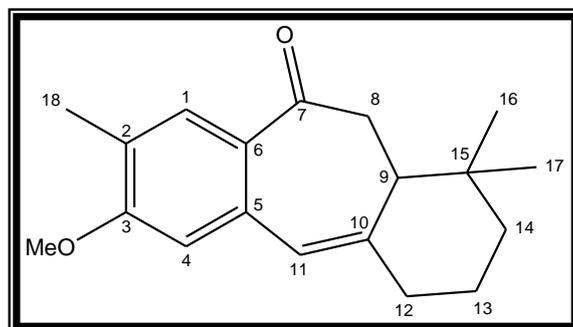
O fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (EECCFD) do extrato etanólico da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* forneceu 10 mg de um sólido branco, solúvel em diclorometano, com ponto de fusão na faixa de 135-136 °C que foi denominado CCF-6 (Figura 48, p. 58).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 49, p. 59) revelou bandas de absorções de deformação axial de ligação C-H de alifático entre 2922 a 2853 cm^{-1} , uma banda de absorção em 1670 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila de cetona conjugada, absorções de 1602 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} que caracterizavam a presença de anel aromático assim como absorção de deformação axial de ligação C–O em 1058 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] (Fig. 52, p. 60) registrou um total de 19 linhas espectrais, sendo dois sinais em δ_{C} 125,7 e δ_{C} 147,8 referentes a carbonos olefinicos, a presença de absorções em δ_{C} 160,9 referente a carbono sp^2 oxigenado e em δ_{C} 201,4 para carbonila de cetona conjugada e sinais entre δ_{C} 113,1 e δ_{C} 136,4 que caracterizam a presença de anel aromático. Após análise e comparação com os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT

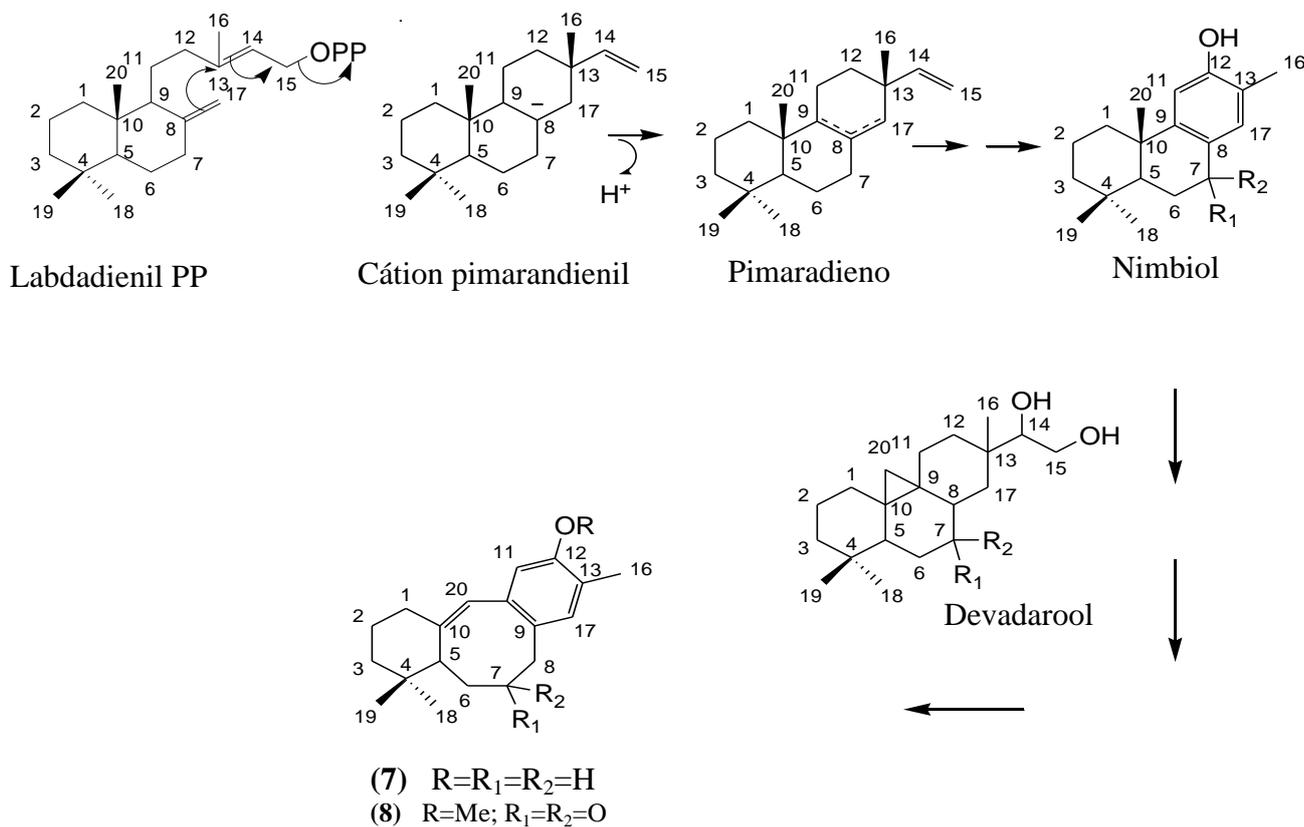
Baseando-se em todas as informações espectrais obtidas (Tabela 7, p. 58), verificou-se que CCF-6 trata-se de um bis-nor-diterpeno que foi identificado como favelina metil éter (Fig. 48), já isolado na espécie *Cnidoscolus phyllacanthus*.

Figura 48 - Estrutura de CCF-6



Dado a importância significativa dos bis-nor-diterpenos, elaborou-se uma proposta para sua biossíntese (Figura 2). Esta proposta inicia-se com o diterpeno labdadienil PP que é então transformado no cátion pimarandienil com perda do pirofosfato OPP. O cátion pimarandienil perde um próton (H^+) formando então o pimaradieno. Este, após formado e após várias etapas, é então convertido em nimbiol, um diterpeno contendo um anel aromático. Este diterpeno, após vários processos biosintéticos é convertido no devadarool, que após perda de dois carbonos forma então o esqueleto básico dos bis-nor-diterpenos.

Figura 49 – Rota Biogénica para a formação de derivados do tricíclico benzociclohepteno



A numeração dos carbonos de deoxofavelina e favelina metil éter respeita as suas origens biossintéticas, como observado em outras referências (ARA *et al.*, 1988) sendo CH-14 substituído por CH-17, diferente da utilizada por Yuichi e coautores (ENDO ; OHTA; NOZOE, 1991a) Tal numeração, diferente das demais registradas na literatura, foi também usada para incluir a Tabela 6 e 7 novamente neste artigo.

Tabela 7 - Dados espectrais comparativos de RMN 1H (300 MHz) e 13C (75 MHz) de CCF-5 e CCF-6, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl₃. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_H) e de carbono-13 (δ_C) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz

	CCF-5				CCF-6			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C								
2	121,1	-	3H-18	1H-4	124,9	-	3H-18	H-4
3	151,7	-	1H-4	1H-1;3H-18	160,9	-	H-4	3H-19; 3H-18
5	135,6	-	-	-	136,4	-	-	-
6	135,4	-	-	-	129,9	-	-	H-4; 2H-8
7	-	-	-	-	201,4	-	-	-
10	145,2	-	1H-9	2H-13	147,8	-	-	2H-8
15	36,9		3H-16; 3H-17	-	38,5		3H-16; 3H-17	2H-8
CH								
1	130,5	6,78 (s)	-	3H-18	131,4	7,63 (s)	-	3H-18
4	116,8	6,56 (s)	-	1H-11	113,1	6,59 (s)	-	-
9	55,1	2,27 (m)	1H-11	2H-7; 2H-14; 3H-16	51,4	2,37 (d, 5,6)	2H-8	3H-16; 3H-17
11	124,9	6,26 (s)	-	1H-4	125,7	6,3 (s)	-	H-4
CH₂								
7	32,8	2,59 (m)	1H-1	-	-	-	-	-
8	30,4	1,48 (m)	2H-7	-	42,7	3,02 (d, 5,6)	-	-
12	41,3	2,38 (m)	-	1H-11	40,3	2,31 (d, 5,3)	-	-
13	24,6	1,64 (m)	-	-	25,2	1,67 (m)	-	-
14	42,5	1,40 (m)	-	3H-16; 3H-17	43,2	1,46 (m)	-	3H-17; 3H-17
CH₃								
16	20,5	0,72 (s)	-	2H-14; 3H-17	20,9	0,76 (s)	-	3H-17
17	30,5	1,00 (s)	-	2H-14; 3H-16	29,1	1,13 (s)	-	3H-16
18	15,4	2,21 (s)	-	1H-1	15,7	2,19 (s)	-	-
MeO	-	-	-	-	55,5	3,88 (s)	-	-

Dados espectroscópicos da substância CCF-6

Figura 50 – Espectro na região do infravermelho de CCF-6

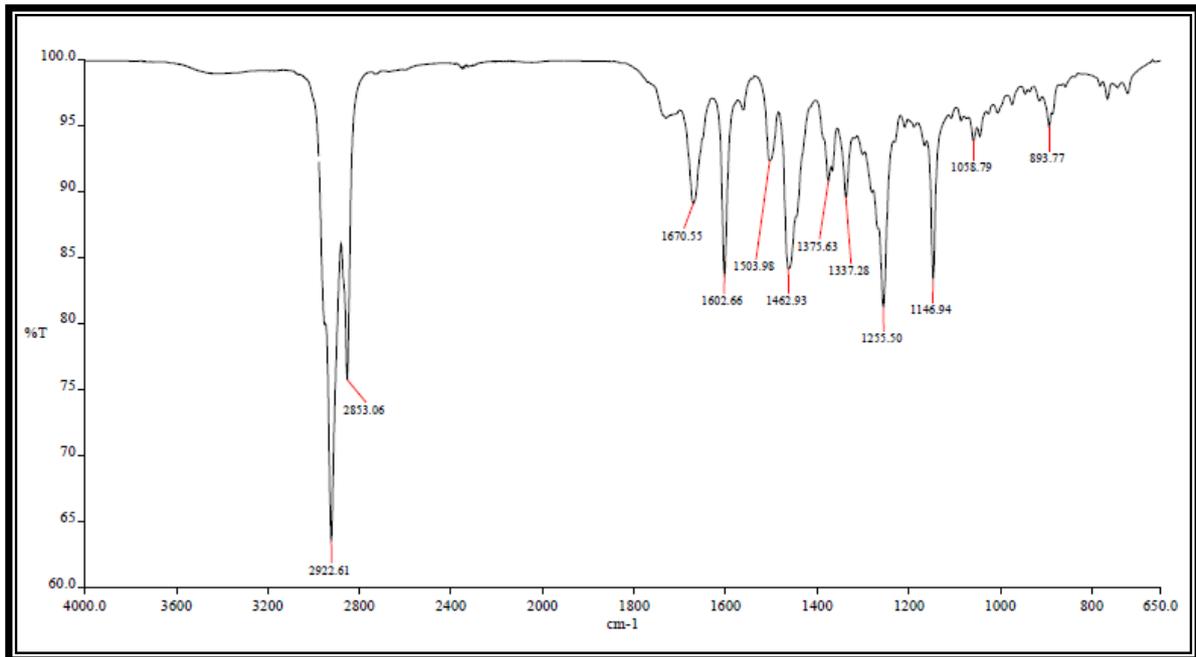


Figura 51 - Espectro de massas (EM-IE) de CCF-6

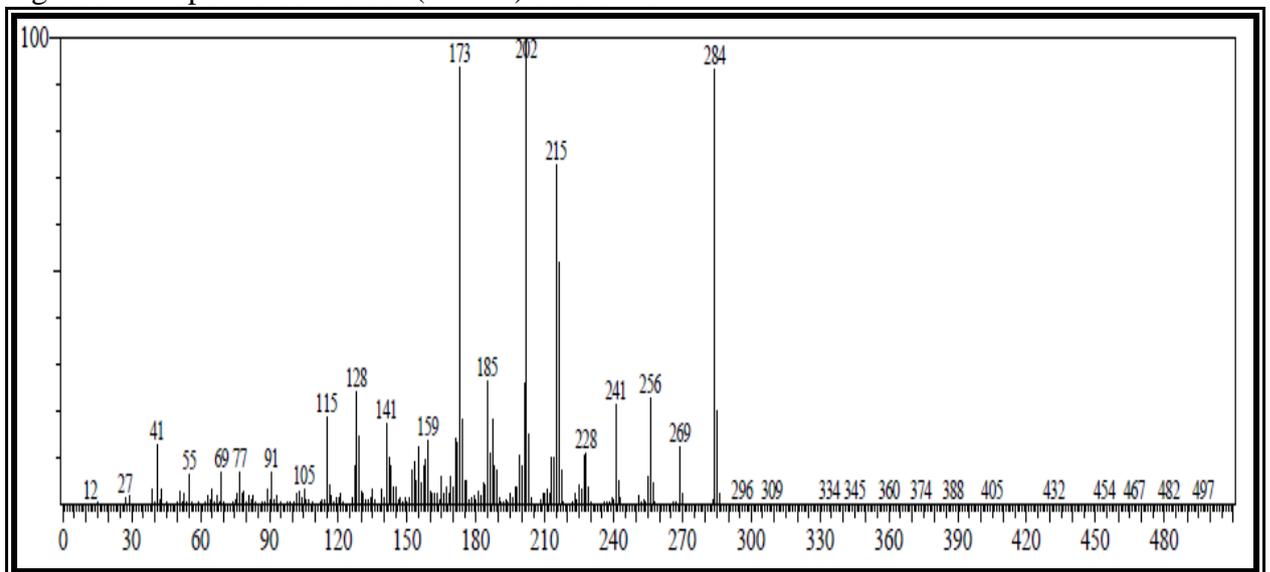


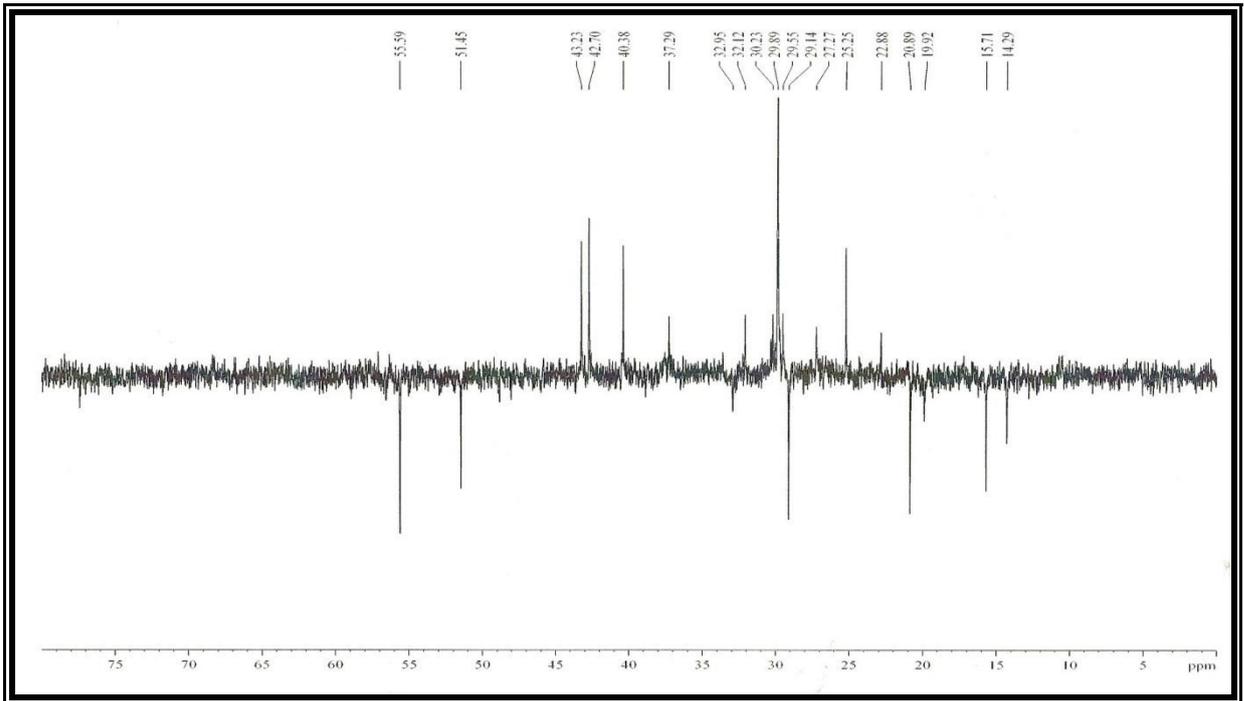
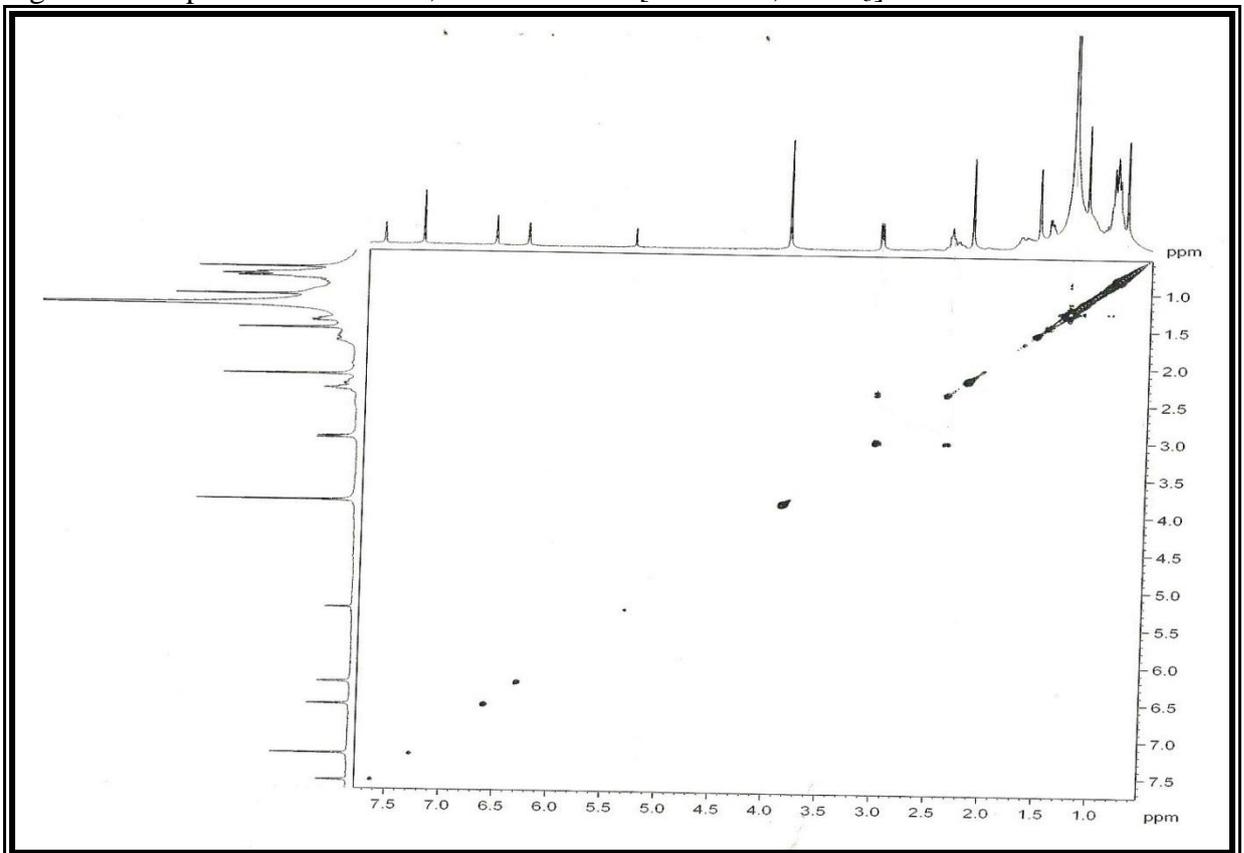
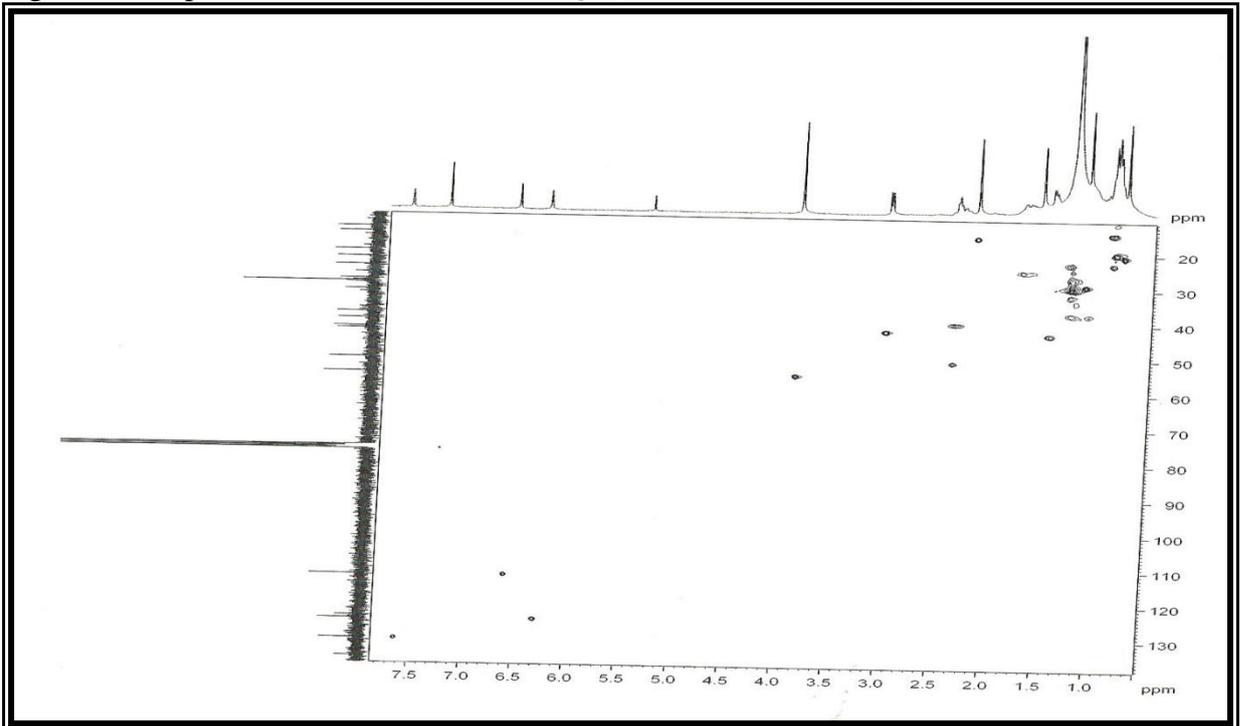
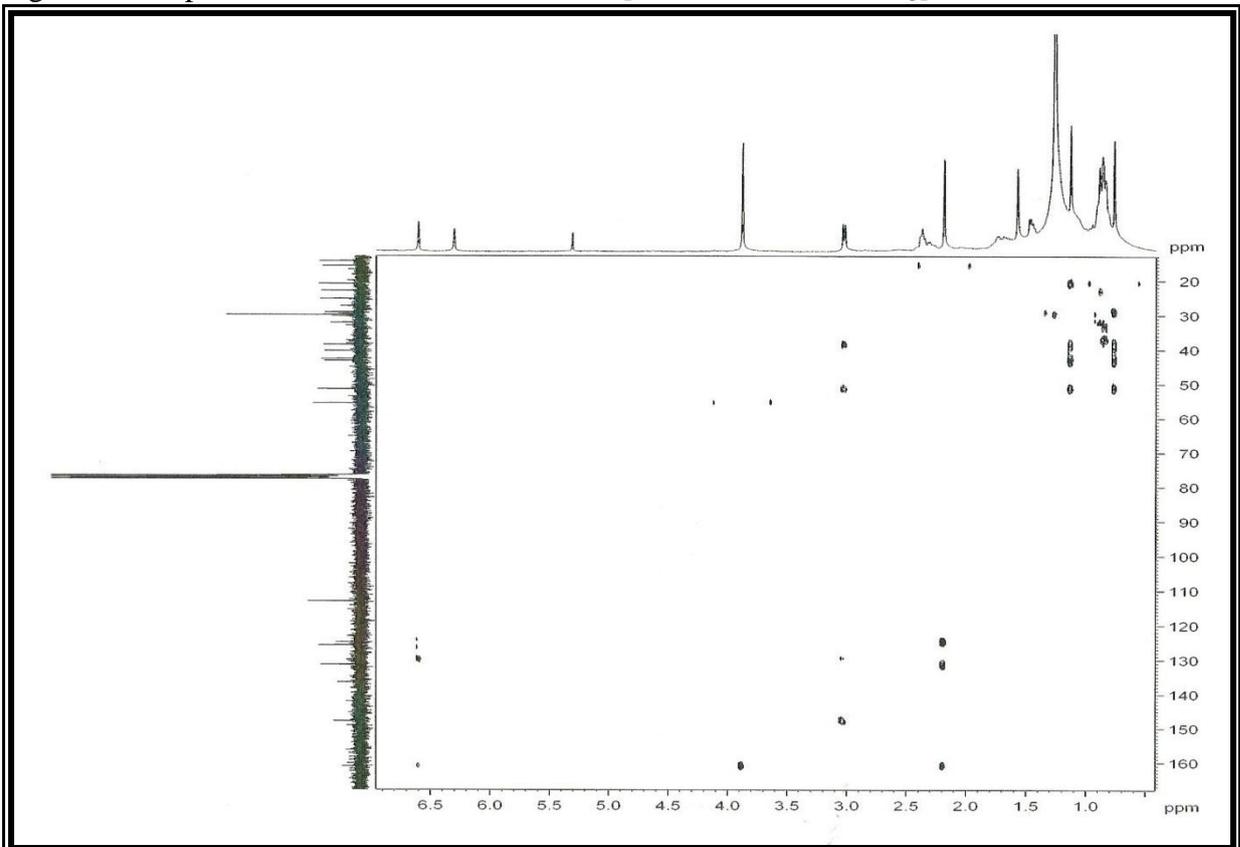
Figura 54 - Espectro invertido de RMN ^{13}C -DEPT 135° [75 MHz, CDCl_3] de CCF-6Figura 55 - Espectro de RMN ^1H , $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY [300 MHz, CDCl_3] de CCF-6

Figura 56 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-6Figura 57 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CCF-6

4.2 Atividade antioxidante

Os extratos hexânicos, etanólico da casca do caule de *C. phyllacanthus* e suas respectivas frações foram submetidos ao teste de atividade antioxidante utilizando o método do sequestro do radical DPPH (HEGAZI et al, 2002). Através dessa metodologia foi observada uma pequena atividade, menor que os padrões, na concentração de 1 mg/mL para a fração AcOEt e CH₂Cl₂ do extrato etanólico (EHCCF), com inibição de radicais de 91,9% e 88,9%, respectivamente. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos no ensaio antioxidante, juntamente com os valores de IC₅₀. Os dados mostram que dentre os extratos testados, o que se revelou mais ativo foi a fração AcOEt com IC₅₀ de $9,20 \times 10^{-2}$ mg/mL, atividade esta inferior ao padrão Trolox e vitamina C.

Tabela 8- Resultado do teste da atividade antioxidante

Substâncias	Concentração (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)
	1,0	0,1	
EECCF	82,4%	23,2%	$0,53 \pm 5,8 \times 10^{-2}$
EECCFM	71,6	14,0%	$0,68 \pm 4,2 \times 10^{-2}$
EECCFA	91,9%	53,4%	$9,20 \times 10^{-2} \pm 3,0 \times 10^{-3}$
EECCFD	88,9%	25,7%	$0,19 \pm 2,7 \times 10^{-3}$
EECCFH	61,3%	10,6%	$0,81 \pm 2,8 \times 10^{-4}$
EHCCF		NA	
EHCCFH		NA	
EHCCFD		NA	
EHCCFA		NA	
EHCCFM		NA	
Trolox	99,9%	99,8%	$2,6 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-4}$
Vitamina-C	99,8%	92,8%	$4,3 \times 10^{-2} \pm 1,9 \times 10^{-2}$

NA – não apresentou atividade

4.3 Atividade citotóxica

Os compostos **CCF-2**, **CCF-5**, **CCF-6** e a mistura de **CCF-3 A** e **CCF-3 B** foram submetidos ao ensaio com MTT (MOSMAM, 1983) para avaliação dos seus efeitos citotóxicos em linhagens celulares HL-60 (leucemia pro-mielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) (Tabela 9). O composto **CCF-5** foi o mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de CI_{50} variando de 2,7 a 8,9 $\mu\text{g/mL}$. É válido acrescentar que o bis-nor-diterpeno (**CCF-2**) foi seletivo para células de leucemia (CI_{50} 1,6 $\mu\text{g/mL}$), uma vez que mostrou uma atividade fraca nas células de diferentes origens histológicas. O resultado destes testes corroboram com os resultados obtidos previamente por Endo e colaboradores (1991a) que relataram atividade citotóxica dos bis-nor-diterpenoides **CCF-5** e **CCF-6** em linhagens celulares de leucemia em murinos (P-388).

Tabela 9. Concentração inibitória em 50% ($CI_{50}\%$) e intervalo de confiança (IC) das amostras em três linhagens tumorais

Compostos	HL-60 ^a	MCF-7 ^b	NCI-H292 ^c
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (Intervalo de Confiança)		
CCF-2	15,6 (10,9 – 22,3)	>25	>25
CCF-3 A/B	>25	>25	>25
CCF-5	2,7 (1,6 – 4,5)	8,9 (6,3 – 12,6)	3,1 (2,2 – 4,3)
CCF-6	1,6 (1,3– 2,1)	>25	10,5 (7,2 – 15,2)
Doxorubicina	0,02 (0,01 – 0,02)	0,3 (0,2 – 0,5)	0,2 (0,1 – 0,5)

^aLeucemia pro-mielocítica humana, ^bAdenocarcinoma de mama humano e ^cCarcinoma de pulmão humano

4.4 Estudo dos ésteres metílicos

Após obtenção dos ésteres metílicos (Fluxograma 1, p. 70) do extrato hexânico da casca do caule de *C. phyllacanthus* (EMCCF), através de reações de saponificação e metilação, os mesmos foram submetidos a técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Com a análise do respectivo cromatograma e dos espectros de massas obtidos, comparados com espectros padrão contidos em banco de dados existente no próprio equipamento bem como dados, da literatura, foi possível a identificação da composição química dos óleos fixos (tabela 10) da amostra estudada.

A análise de CG/EM permitiu a identificação de 14 ésteres metílicos, tendo o hexadecanoato de metila, correspondendo a 22,31%, como o majoritário.

Tabela 10 - Composição química do óleo fixo de *Cnidocolus phyllacanthus*

Composto	TR (min)	PM	% Total
Tetradecanoato de metila	19,47	242	1,88
Pentadecanoato de metila	21,42	256	1,07
Hexadecanoato de metila	22,97	270	22,31
Isoheptadecanoato de metila	23,78	284	5,73
14-metil-Hexadecanoato de metila	23,90	284	7,96
Heptadecanoato de metila	24,23	284	2,75
Cis-9-Octadecenoato de metila	25,08	296	8,74
Octadecanoato de metila	25,36	298	13,25
Nonadecanoato de metila	26,01	312	2,24
Docosanoato de metila	28,99	354	2,53
Tricosanoato de metila	29,77	368	1,31
Tetracosanoato de metila	30,52	382	5,64
Pentacosanoato de metila	31,23	396	2,64
Hexacosanoato de metila	31,92	410	4,60
Total			82,65

T.R. = tempo de retenção; P. M. = peso molecular

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal e linhagens tumorais

O trabalho de pesquisa realizado teve como objetivo o estudo químico da espécie vegetal *Cnidocolus phyllacanthus*, onde as amostras da casca do caule da usadas para estudo foram coletadas no município de Apodi-RN.

As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia (UFC), onde foram identificadas pelo professor Afrânio Gomes Fernandes e registrada sob o número 14923.

As linhagens tumorais utilizadas, HL60 (leucemia pro-mielocítica), NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro.

5.2 Métodos Cromatográficos

5.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram executadas utilizando gel de sílica 60, com granulometria de 70-230 mesh, da marca VETEC (cromatografia gravitacional). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de gel de sílica empregada.

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em proporções crescente de polaridade. Os solventes utilizados nos procedimentos eram de qualidade P.A.

5.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Nas cromatografias em camada delgada (CCD), foram usadas placas de vidro com dimensões de 10 x 5 cm, revestidas em uma das faces por gel de sílica 60 G da marca VETEC, código 1094, e cromatoplasmas de gel de sílica 60, 2-25 μm , com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (Merck).

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas foram realizadas pela pulverização com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento com soprador térmico.

Os extratos e as frações resultantes das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Fisaton – modelo 801.

5.3 Métodos espectroscópicos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN/UFC).

5.3.1 Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e filme de cloreto de sódio (NaCl) para análise das amostras.

5.3.2 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo 17-A, acoplado a cromatógrafo de gás-líquido Shimadzu, modelo GC-MS – QP5050A. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização por *electronspray* (EM-IES), modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) da SHIMADZU.

5.3.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13.

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi o clorofórmio (CDCl_3).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente clorofórmio (δ_{H} , 7,27) e para os espectros de RMN ^{13}C pelos picos de carbono-13 do solvente clorofórmio (δ_{C} , 77,23).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dublete), dd (duplo dublete), dl (dublete largo), dt (dublete triplo), t (triplete) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° (CH e CH₃ com amplitudes em oposição aos CH₂). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro da técnica DEPT 135° pelos sinais do espectro da técnica BB. Segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

5.4 Métodos físicos

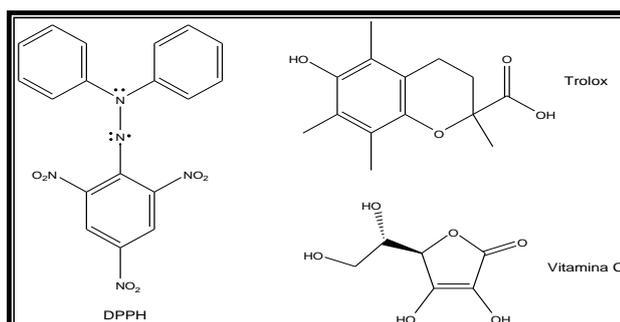
5.4.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, modelo FP62. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min.

5.5 Atividade antioxidante: método de sequestro do radical DPPH

A metodologia utilizada no teste de atividade antioxidante foi a do seqüestro de radicais livres, semelhante à descrita por Hegazi et al., (2002), onde o radical utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (Fig. 13) na concentração de 60 µmol.L⁻¹. Amostras nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 1,0 mg/mL foram dissolvidas em metanol e 1,0mL de cada amostra foi adicionada a uma solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60 µmol.L⁻¹. Foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, após 30 min. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. Os resultados mostrados na Tabela 8 (pág. 63) representam a média aritmética de 3 leituras. Como padrões positivos de referência (Fig. 57) utilizaram-se Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e Vitamina-C (ácido ascórbico).

Figura 58 - Estruturas do DPPH, Trolox e Vitamina-C



5.6 Identificação dos óleos fixos da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus*

5.6.1 Obtenção dos extratos

A amostra da *Cnidoscolus phyllacanthus* (2,098 kg da casca do caule), obtida no município de Apodi-RN, foi extraída exaustivamente com hexano e em seguida etanol. As soluções obtidas foram concentradas em rota evaporador, sob pressão reduzida à temperatura média de 60 °C, para obtenção, após evaporação do solvente, fornecendo os respectivos extratos (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados referentes aos extratos obtidos de *Cnidoscolus phyllacanthus*

Extrato	Sigla	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexânico	EHCCF	40 g	1,3
Etanólico	EECCF	60 g	2,9

5.6.2 Obtenção dos ácidos graxos livres da *Cnidoscolus phyllacanthus*

Do extrato hexânico de EHCCF, obtido anteriormente, foram pesados aproximadamente 2 g que foram parcialmente dissolvidos em 30 mL de MeOH e adicionados 2,0 g de hidróxido de potássio (KOH). A mistura foi mantida sob refluxo durante 1 h e, após esse período, a mesma foi resfriada a temperatura ambiente e concentrada. Em seguida foram adicionados 50 mL de água destilada e a solução obtida foi extraída 3 vezes com 50 mL de hexano.

Após extração, a fração orgânica foi seca utilizando Na₂SO₄ anidro, concentrada e pesada obtendo-se 229,4 mg de material insaponificável. A fração aquosa foi acidificada com HCl concentrado até aproximadamente pH 3 e em seguida extraída 3 vezes com 50 mL de AcOEt. A esta fração orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro e a mesma foi concentrada fornecendo 925 mg de ácidos graxos livres.

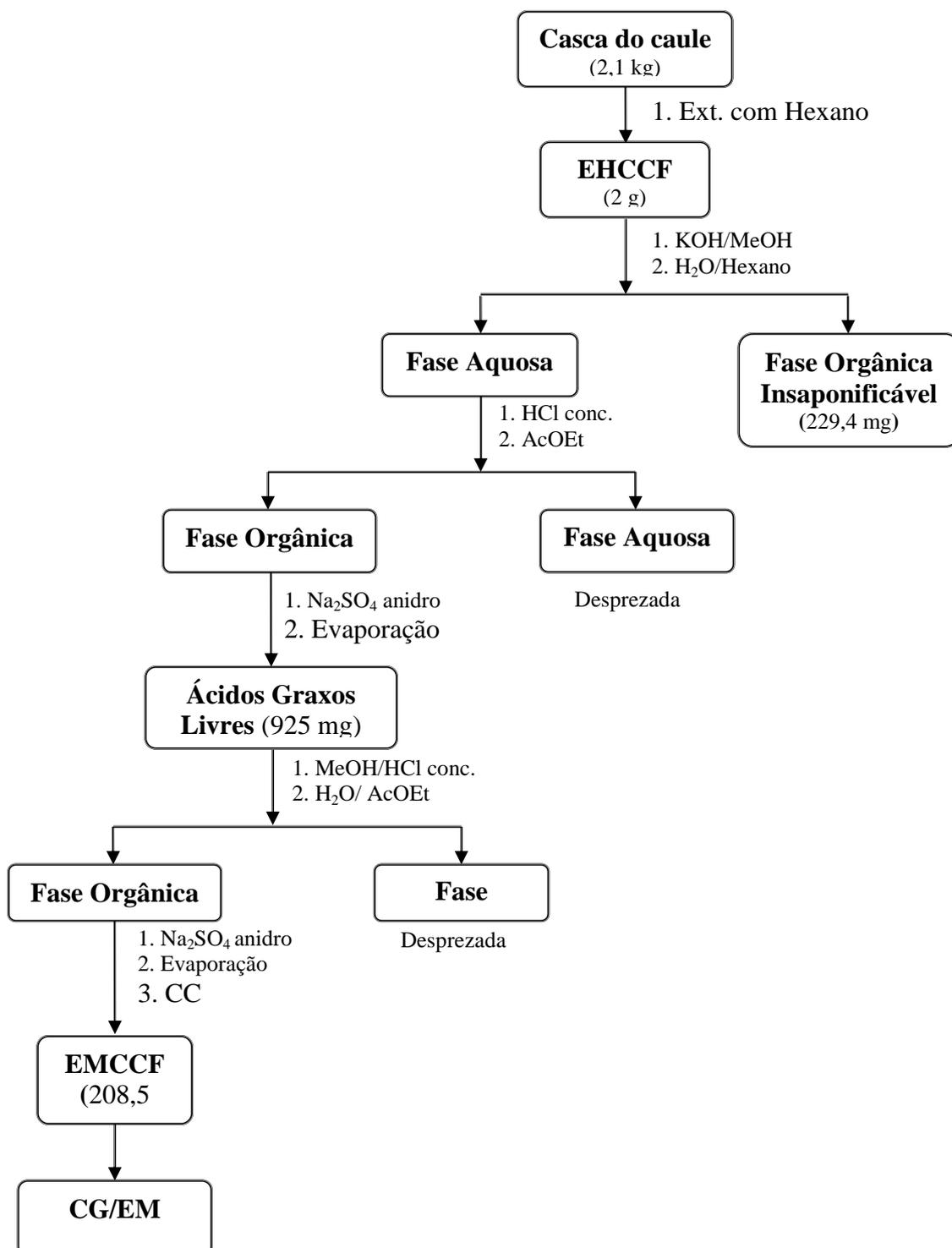
5.6.3 Obtenção dos ésteres metílicos da *Cnidoscolus phyllacanthus*

O material obtido da saponificação (ácidos graxos livres das amostras da casca do caule da *Cnidoscolus phyllacanthus*) foi parcialmente dissolvido em 20 mL de álcool metílico e foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e a mistura foi mantida sob refluxo durante 1 h. Após resfriamento do material, o mesmo foi concentrado e adicionado 25

mL de água destilada e a solução aquosa foi extraída 3 vezes com 30 mL de AcOEt obtendo-se assim 208,5 mg de ésteres metílicos dos respectivos ácidos graxos livres.

Os ésteres metílicos obtidos (Fluxograma 1) foram submetidos à coluna cromatográfica em gel de sílica utilizando-se como eluentes misturas binárias de Hex:CHCl₃ em ordem crescente de polaridade. O material obtido foi denominado EMCCF e analisado em CG/MS.

Fluxograma 1 - Obtenção e caracterização dos ésteres metílicos da casca do caule da *Cnidoscopus phyllacanthus* a partir de seu extrato hexânico.



5.7 Obtenção dos metabólitos secundários de *Cnidoscolus phyllacanthus*

5.7.1 Fracionamento cromatográfico de EHCCF e EECCF

Uma parte dos extratos EHCCF (10g) e EECCF (12 g) foram adsorvidos em gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e submetido à coluna filtrante, utilizando como eluentes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros, em ordem crescente de polaridade. As frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida e os pesos obtidos estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12-Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHCCF e EECCF

<i>Eluente</i>	<i>Fração</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Fração</i>	<i>Peso</i>
Hexano	EHCCFH	4,32 g	EECCFH	837 mg
Diclorometano	EHCCFD	1,41 g	EECCFD	6,25 g
Acetato de etila	EHCCFA	2,01 g	EECCFA	1,64 g
Metanol	EHCCFM	675,70 mg	EECCFM	2,05 g
Total		8,4157 g		10,777 g

5.7.2 Estudo cromatográfico dos insaponificáveis e isolamento da substância CCF - 1

O material insaponificável (229,4 g), obtidos no processo de saponificação, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. A fração 43-49 (79 mg), eluída com Hex:AcOEt (6:4), quando submetida a nova cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando hex, AcOEt e MeOH, em gradiente crescente de polaridade, forneceu na fração 19, eluída com Hex:AcOEt (9:1). Desta maneira foi possível isolar um composto orgânico apresentado como um sólido branco e solúvel em clorofórmio na quantidade de 160,8 mg, codificado como CCF-1. É importante ressaltar que o metabólito codificado como CCF-1 também foi obtido a partir da cromatografia em coluna de algumas frações derivadas dos extratos brutos. Assim, a quantidade total obtida desse metabólito foi consideravelmente maior que 160,8 mg. Comparação desta substância com outras isoladas desta espécie em estudo anterior permitiu identificação de CCF - 1 como sendo o lupeol. Dados espectroscópicos incluindo RMN ¹H e ¹³C, IV (infra-vermelho) confirmou a estrutura proposta.

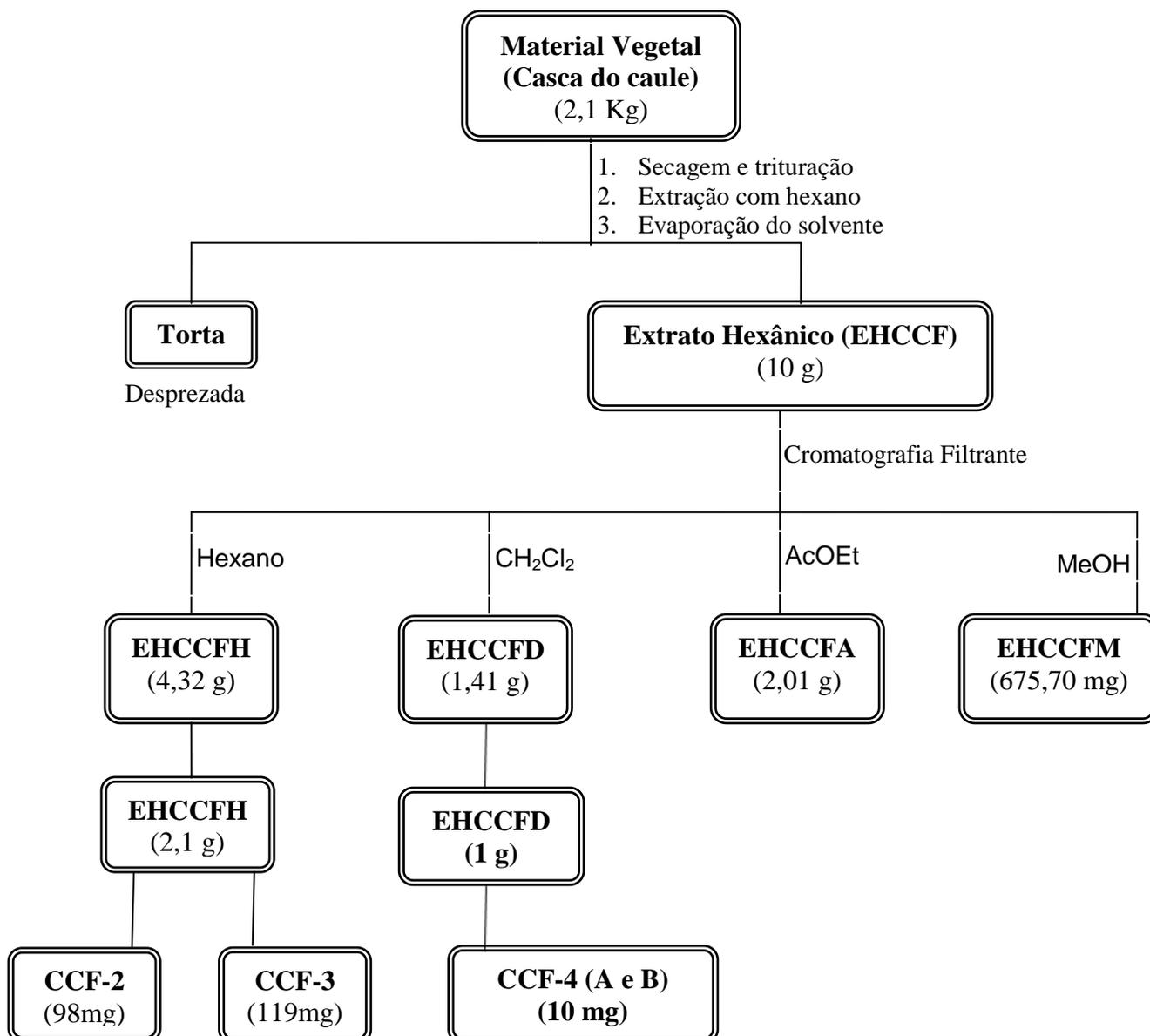
A comparação com dados da literatura ajudou na identificação desses compostos.

5.7.3 Fracionamento cromatográfico da fração EHCCFH e isolamento da substância CCF-2, CCF-3 e CCF-4

Parte da fração hexano do extrato hexânico EHCCFH (2,1 g), obtida do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico EHCCF, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. A fração 22-25 (25 mg) foi eluída com Hex:CH₂Cl₂ (6:4) e a fração 29 (30 mg), eluída com Hex:CH₂Cl₂ (4:6). Esse processo permitiu o isolamento dos compostos codificados como CCF-2 e CCF-3 (Fluxograma 2), nas quantidades de 98 mg e 119 mg, respectivamente. É importante ressaltar que os metabólitos codificados como CCF-2 e CCF-3 também foram obtidos a partir da cromatografia em coluna da fração diclorometano EHCCFD.

Parte da fração diclorometano do extrato hexânico EHCCFD (1,0 g), obtida do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico EHCCF, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. O tratamento cromatográfico da fração 50-61 (144,5 mg), eluída com Hex:AcOEt (7:3), em coluna de gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, resultou na obtenção da fração 19-22, eluída com Hex:AcOEt (8:2). Esse processo permitiu o isolamento dos compostos codificados como CCF-4 (Fluxograma 2), na quantidades de 10 mg.

Fluxograma 2 - Fluxograma do isolamento da substância CCF-2, CCF-3 e CCF-4 obtida a partir do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidoscopus phyllacanthus*.

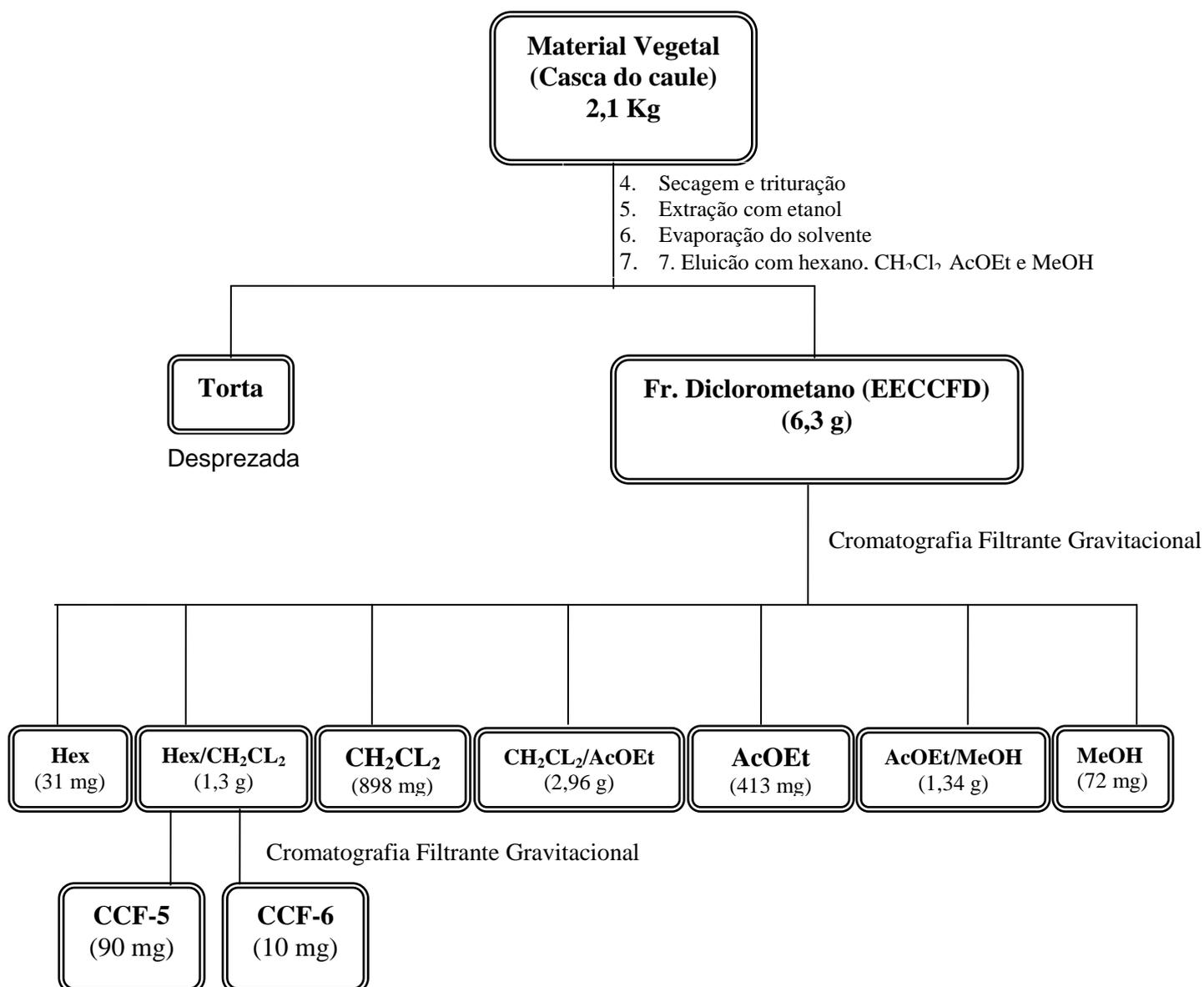


5.7.4 Fracionamento cromatográfico da fração EHCCFD e isolamento da substância CCF-5 e CCF-6.

Parte da fração diclorometano do extrato etanólico EECCFD (6,03 g), obtida do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico EECCF, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade (1:1), resultando nas frações Hex (31 mg); Hex: CH₂Cl₂ (1,3 g); CH₂Cl₂ (898 mg); CH₂Cl₂:AcOEt (2,96 g);

AcOEt (413 mg); AcOEt:MeOH (1,34 g) e MeOH (72 mg). Uma parte da fração Hex: CH₂Cl₂ (1,10 g) foi adsorvida em gel de sílica, submetida à várias colunas filtrantes e eluídas com misturas de hexano, AcOEt e MeOH, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se um total de 97 frações de 10 mL. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 40-41 (90 mg), eluída com Hex:AcOEt (7:3) e a fração 24-35 (850 mg), eluída com Hex:AcOEt (9:1), foi submetida a novo tratamento cromatográfico em gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se na fração 49, eluída com Hex:AcOEt (7:3). Esse processo permitiu o isolamento dos compostos codificados como CCF-5 (Fluxograma 3), na quantidades de 90 mg e de CCF-6 (Fluxograma 3) na quantidade de 10 mg.

Fluxograma 3 - Fluxograma do isolamento da substância CCF-5 e CCF-6, obtida a partir do extrato etanólico da casca do caule de *Cnidoscopus phyllacanthus*.



5.8 Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram HL60 (leucemia pro-mielocítica), MCF-7 (carcinoma da mama) e NCIH292 (câncer de pulmão) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). As células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Analisou-se a citotoxicidade dos compostos contra todas as três linhagens celulares tumorais, utilizando 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis). A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm (DTX 880 multimodo, Beckman Coulter, Inc., Fullerton).

As linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL e a de HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de $0,3 \times 10^6$.

Os compostos **CCF-2**, **CCF-5**, **CCF-6** e a mistura de **CCF-3 A** e **CCF-3 B** foram previamente dissolvidos em DMSO estéril foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazólio), e as placas foram incubadas por 3 h. Decorrido este período, a absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os valores de CI₅₀ e seus respectivos intervalos de intervalos de confiança foram obtidos por regressão não linear usando o programa *Graphpad Prism*, versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, California, Estados Unidos). Cada amostra foi testada em duplicata. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato hexânico e etanólico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus* possibilitou o isolamento e a caracterização de quatro constituintes e duas misturas (Fig. 58, p. 76) o triterpeno Lupeol (**CCF-1**), um éster do lupeol identificado como nonanoato de lupeol (**CCF-2**), uma mistura identificada como cinamato de lupeol (**CCF-3 A**) com diidrocinamato de lupeol (**CCF-3 B**), uma mistura identificada como esteroide sitosterol (**CCF-4 A**) e estigmasterol (**CCF-4 B**) e dois bis-nor-diterpeno, sendo o (**CCF-5**) identificado como deoxofavelina e o (**CCF-6**) identificado como favelina metil éter.

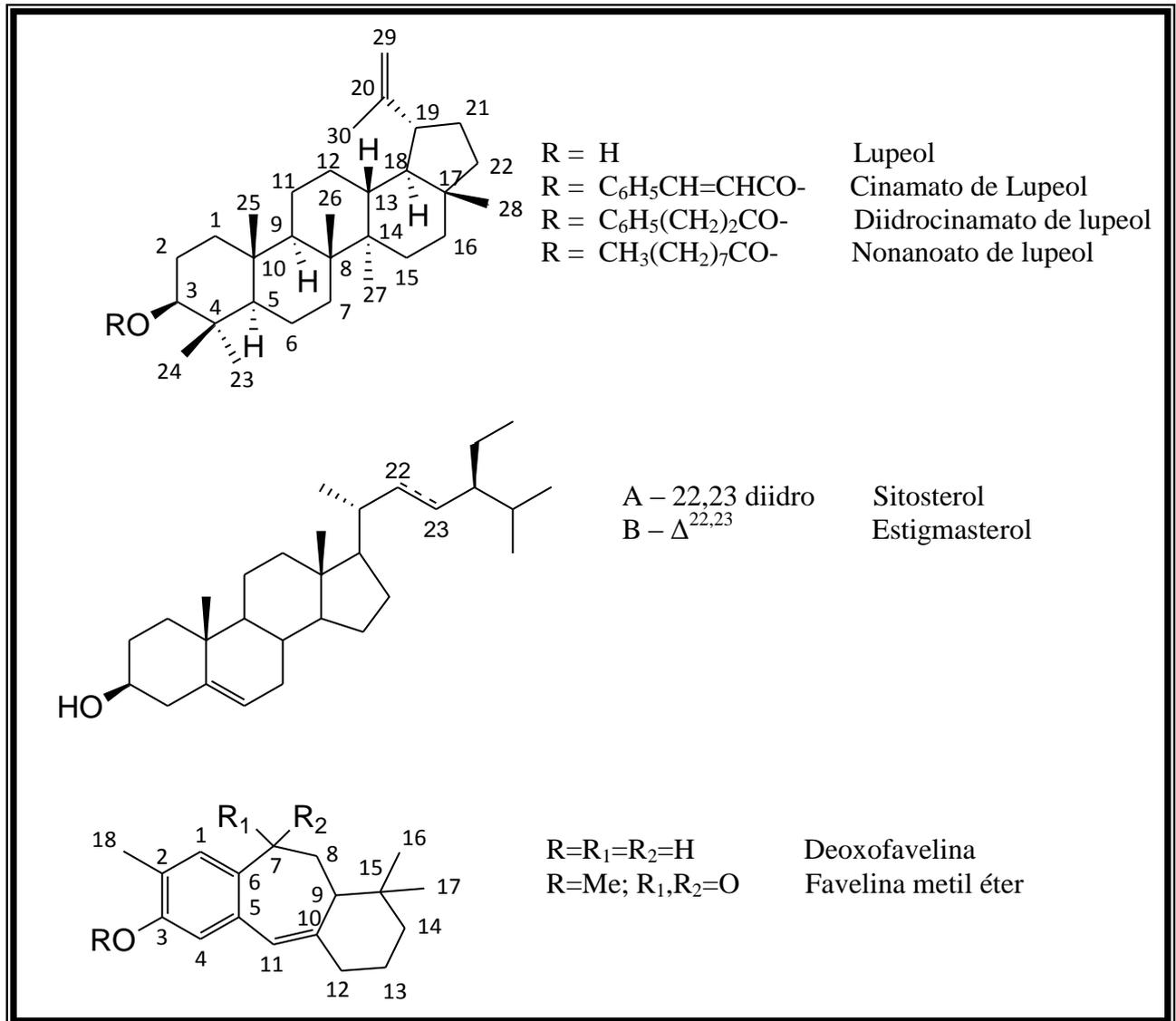
O derivado isolado como nonanoato do lupeol (**CCF-2**) foi citado pela primeira vez nesta espécie. O isolamento de derivados acilados do lupeol em espécies de *Cnidoscolus* reforça a importância deste tipo de compostos como possíveis quimiomarcadores para o gênero.

Após obtenção dos ésteres metílicos das amostras do extrato hexânico da casca do caule através de reações de saponificação e metilação, a análise de CG/EM permitiu a identificação de 14 ésteres metílicos, (82,65% da composição total do óleo) tendo o hexadecanoato de metila, correspondendo a 22,31%, como o majoritário.

Os extratos da casca do caule da *Cnidoscolus phyllacanthus* e suas frações apresentaram pouca ou nenhuma atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. Das substâncias testadas, a que se revelou mais ativa foi a fração EHCCFA, com IC_{50} de $9,2 \times 10^{-2}$ mg/mL, sendo este valor inferior aos padrões trolox e vitamina C, demonstrando que a *Cnidoscolus phyllacanthus* possui baixa característica antioxidante.

Foi possível observar um significativo potencial citotóxico dos dois bis-nor-diterpenos **CCF-5** e **CCF-6** para as 3 linhagens de células tumorais e do composto derivado do lupeol **CCF-2** apenas para a linhagem HL-60 referente a leucemia pro-mielocítica A atividade citotóxica observada, principalmente, pelo bis-nor-diterpeno **CCF-5** pode levar ao desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

Os resultados apresentados neste trabalho motivam a continuação do estudo fitoquímico de *Cnidoscolus phyllacanthus*, na busca de novos compostos com atividade farmacológica.

Figura 58 - Constituintes químicos aislados de *Cnidoscolus phyllacanthus*

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. L. **Estudo dos constituintes químicos de duas amostras de própolis: Alto Santo - Ceará e Passa Quatro - Minas Gerais.** 2007. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTO, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ARA, I.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, S. Tricyclic diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 1054, 1988.
- ARAUJO, L. D. A.; LEAL, A. S.; QUIRINO, Z. G. M. Fenologia e biologia floral da urtiga cansanção *Cnidoscopus urens* L., Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 140-146, 2012.
- BATISTA, C. E. A.; MENESES, C. H. S. G.; DANTAS, J. P.; HOFFMANN, L. V.; ESTEVAM, A. T.; BARROSO, P. A. V. Variabilidade molecular de acessos de faveleira [*Cnidoscopus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax & Hoffm.] inermes e com espinhos. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.11, n.1, p. 31-36, 2007.
- BHATTACHARYYA, J.; BARROS, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscopus urens*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 274, 1986.
- BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; HESS, S. C.; CAVALHEIRO, A. J.; MONACHE, F. D. Acyl lupeols from *Cnidoscopus vitifolius*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1127, 1998
- CABALLERO, P.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H.; FERNANDEZ, S.; HERNANDEZ, E. The Isolation and Molecular Structure of Lupeol β -Phenylpropionate from *Cnidoscopus elasticus*. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 819, 1984.
- CANDIDO, L. P. **Bioatividade de extratos vegetais sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de *Aedes (stegomyia) aegypti*.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental (MCTA)) Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.
- CANDIDO, L. P.; CAVALCANTI, M. T.; BESERRA, E. B. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, 2013.
- CARUZO, M. B. R. **Sistemática de *Cróton sect.* *Cleodora* (Euphorbiaceae s. s.).** 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

- CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. A.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.
- CORDEIOR, R. S.; ARAGÃO, J. B.; MORHY, L. The presence of histamine in *Cnidosculus oligandrus* (Euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 123-128, 1983.
- DELGADO, G.; HERNANDEZ, J.; RIOS, M. Y.; AGUILAR, M. I. Pentacyclic Triterpenes from *Cnidosculus multilobus*. **Planta Medica**, v. 60, p. 389-390, 1994.
- DOMINGUEZ, X. A.; FRANCO, R.; GARCIA, S.; PUGLIESE, O.; SANTOYO, A. Lupeol Esters isolated from latex of Chilte (*Cnidosculus elasticus* Lundell). **Revista Latinoamericana de Química**, v. 13, p. 82, 1982.
- ENDO, Y.; OHTA, T.; NOZOE, S. Favelines, novel tricyclic benzocycloheptenes with cytotoxic activities from brazilian plant, *Cnidosculus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 26, p. 3083-3086, 1991a.
- ENDO, Y.; OHTA, T.; NOZOE, S. Favelines, favelanone, a novel tetracyclic cyclopropane derivative From the brazilian plant, *cnidosculus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v. 132, n. 40, p. 5555-5558, 1991b.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.
- HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 395-402, 2002.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa/2014 – Incidência de Câncer No Brasil*, INCA: Rio de Janeiro, 2014.
- KROGH, R. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie Ipomoea pés-caprae (Convolvulaceae). Estudos em química medicinal de análogos do ácido gálico**. 2001, 173p. Dissertação (mestrado em química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.
- KUTI, J. O.; KONURU, H. B.; Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidosculus* spp.). **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 52, p. 117-121, 2004.
- LEMOS. T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; OLIVEIRA, M. F. Terpenoids from *Cnidosculus phyllacanthus* Pax et Hoff. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v.2, n. 3, p. 105-110, 1991
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. 1 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002. 512 p.

MELO, L. A.; SALES, M. F. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3 p. 806-827, 2008.

MELO, K. N.; SILVA, A. M.; NASCIMENTO, P. G. G.; BIZERRA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G. **Obtenção de derivados do triterpeno lupeol isolado em *Cnidoscolus phyllacanthus***. In: XXXI Encontro de Iniciação Científica, 31, 2012, Fortaleza. Disponível em <<http://www.prppg.ufc.br/eu/2012/index.php/trabalhos-aceitos/por-titulo>>. Acesso em: 10/06/2014.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OHTA, T.; ENDO, Y.; KIKUCHI, R.; KABUTO, C.; HARADA, N.; NOZOE, S. Absolute stereochemistry of benzocycloheptenone derivatives from *Cnidoscolus phyllacanthus*. **Tetrahedron** v. 50, n. 19, p. 5659-56681, 1994a.

OHTA, T.; ENDO, Y.; KIKUCHI,; NOZOE, S. Faveloxide, a new isoprenoid derivative from the Brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. **Heterocycles**. v, 38. P. 55-56. 1994b.

OLIVEIRA, D.M.; PIMENTEL, L. A.; ARAUJO, J. A. S.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Cnidoscolus phyllacanthus* (Euphorbiaceae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 36-42, 2008.

OLIVERIA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P.; Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 69-71, 2007.

RAMIREZ-GONZALEZ, Irama; VILLALOBOS, Darly. Triterpenos aislados del *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst. **Ciencia**, Maracaibo, v. 16, n. 1, p. 20-24, 2008 .

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNANDEZ, I.; ALBAN, J.; LOCK, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 199-204, 2003.

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

Schering Aktiengesellschaft (DE), **Síntese de benzocicloheptenos substituídos por oxigênio como valiosos produtos intermediários para a preparação de estrogênios seletivos em tecidos**. BR n PI0213234-6, 14 out. 2002, 12 abr. 2004. Disponível em <<http://www.patentesonline.com.br/s-ntese-de-benzocicloheptenos-substitu-dos-por-oxig-nio-como-valiosos-produtos-intermedi-20662.html#adsense1>>. Acesso em: 10/06/2014.

Schering Aktiengesellschaft (DE), **Benzocicloheptenos, processo para a sua preparação, preparados farmacêuticos, que contêm os mesmos bem como seu emprego para a preparação de medicamentos.** BR n. PI9912240-5, 19 jul. 1999, 18 jan. 2001. Disponível em <<http://www.patentesonline.com.br/benzocicloheptenos-processo-para-a-sua-prepara-o-preparados-farmac-uticos-que-cont-125484.html>>. Acesso em: 10/06/2014.

Sítio da World Health Organization. Disponível em:
http://who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/. Acesso em: 28 agosto 2014.

SOUZA, B.B.; BATISTA, N. L.; OLIVEIRA, G. J. C. Utilização da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus*) como fonte de suplementação alimentar para caprinos e ovinos no semiárido brasileiro. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 8, n. 1, p.23-27, 2012.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Popular phytotherapy: the instrumental search as therapy. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

YUAN, W.; LI, S; OWNBY, S., Z.; ZHANG, Z.; WANG, P.; ZHANG, W.; BEASLEY, R. S. Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidoscopus texanus*, **Planta Medica**, v. 73, p. 1304-1308, 2007.

APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA

Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidoscolus phyllacanthus*

Paula, A. C.; Melo, K. M.; da Silva, A. M.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; Santiago, G. M. P.; Lemos, T. L. G.*; Braz-Filho, R.; Militão, G. C. G.; da Silva, P. B. N.; da Silva, T. G.

Chemical Constituents and Cytotoxic Activity of *Cnidoscolus phyllacanthus*

Abstract: The chemical reinvestigation of the hexanic extract of the stem bark of *Cnidoscolus phyllacanthus* allowed the isolation of 3 β -*O*-nanoyl lupeol (**1**), the mixture of 3- β -*O*-cinnamoyl lupeol (**2**) and 3- β -*O*-dihydrocinnamoyl lupeol (**3**), lupeol (**4**), the mixture of steroids sitosterol (**5**) and stigmasterol (**6**), deoxofaveline (**7**) and faveline methyl ether (**8**). The structures of compounds were identified on the basis of their spectral data and by comparison of these data with values of literature. This is the first report involving the isolation of 3 β -*O*-nanoyl lupeol (**1**) from this species. Compounds **1**, **7**, **8** and the mixture of **2** and **3** were tested for their cytotoxic activity against the cell lines HL-60 (human promyelocytic leukemia), NCI-H292 (human lung carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma). Compound **7** was the most active among all, with IC₅₀ values ranging from 2.7 to 8.9 μ g/mL.

Keywords: *Cnidoscolus phyllacanthus*; Euphorbiaceae; terpenoids; Cytotoxic activity.

Resumo

A reinvestigação química do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus* permitiu o isolamento de 3 β -*O*-nanoil-lupeol (**1**), a mistura de 3- β -*O*-cinamoil-lupeol (**2**) e 3- β -*O*-diidrocinaoil-lupeol (**3**), lupeol (**4**), a mistura de sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**), deoxofavelina (**7**) e favelina metil éter (**8**). As estruturas dos compostos foram identificadas com base nos seus dados espectrais e por comparação com a literatura. Este é o primeiro relato de identificação de 3 β -*O*-nanoil-lupeol (**1**) nesta espécie. Os compostos **1**, **7**, **8** e a mistura de **2** e **3** foram testados quanto à sua atividade citotóxica contra as linhagens celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana), NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano). O composto **7** foi o mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de CI₅₀ variando de 2,7 a 8,9 μ g/mL.

Palavras-chave: *Cnidoscolus phyllacanthus*; Euphorbiaceae; terpenoides; Atividade citotóxica.

*Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, 60021-940, Fortaleza-CE, Brasil.
tlemos@dqoi.ufc.br

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA

Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidoscolus phyllacanthus*

Anderson C. Paula,^a Karina M. Melo,^b André M. da Silva,^a Daniele A. Ferreira,^a Francisco J. Q. Monte,^a Gilvandete M. P. Santiago,^b Telma L. G. Lemos^a, Raimundo Braz-Filho,^c Gardênia C. G. Militão,^d Paulo B. N. da Silva,^d Teresinha G. da Silva^d

^aUniversidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, 60021-940, Fortaleza-CE, Brasil.

^bUniversidade Federal do Ceará, Departamento de Farmácia, Rua Capitão Francisco Pedro N° 1210, Campus do Porangabussu, 60430-370, Fortaleza-CE, Brasil.

^cUniversidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Ciências Químicas - CCT, Av. Alberto Lamego, N° 2000, 28013-600, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

^dUniversidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rua Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.

*tlemos@dqoi.ufc.br

1. Introdução

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

2.2. Material vegetal

2.3. Extração e isolamento dos constituintes

2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados

2.5. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

3. Resultados e Discussão

4. Conclusões

1. Introdução

O gênero *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) compreende cerca de 50 a 75 espécies, distribuídas exclusivamente na América Tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil.¹

Cnidoscolus phyllacanthus (Mull. Arg.) Fern. Casas, conhecida popularmente como “favela”, “faveleiro”, “faveleira” ou “queimadeira”, é uma espécie nativa da caatinga do Nordeste brasileiro.² Suas folhas secas, cascas e ramos são muito usados na alimentação de caprinos, ovinos e asininos, e suas sementes fornecem um óleo fixo e uma farinha com elevado teor proteico e mineral³ e sem toxicidade.⁴ Casos de intoxicação espontânea têm sido relatados em animais que comem essa planta, especialmente ramos recentemente cortados.⁵ Todas as suas partes são empregadas na medicina popular contra inflamações, dermatoses e para remover verrugas.² Estudos fitoquímicos desta espécie descreveram a ocorrência de aminoácidos⁶ e terpenóides.⁷⁻¹³

Estimativas da Organização Mundial de Saúde demonstraram que anualmente surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes, tornando-se, em países desenvolvidos, a segunda causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares.¹⁴ No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer.¹⁵

Do total de 175 novos fármacos anticâncer utilizados na terapêutica no período de 1981 a 2010, 80% revelaram-se como produtos naturais ou como compostos sintéticos ou semissintéticos baseados em produtos naturais.¹⁶ Desta forma, a busca por novas terapias para esta enfermidade torna-se indispensável, sendo as plantas fontes ricas de novos fármacos para o tratamento e prevenção do câncer.

Este trabalho descreve os resultados obtidos da reinvestigação fitoquímica da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus*, bem como a avaliação da atividade citotóxica de 3 β -*O*-nanoiil-lupeol (**1**), deoxofavelina (**7**), favelina metil éter (**8**) e a mistura de 3- β -*O*-cinamoil-lupeol (**2**) e 3- β -*O*-diidrocinamoil-lupeol (**3**).

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, modelo FP62, e não foram corrigidos. Os espectros na região do IV foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, em pastilha de KBr. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , uni- 1D) e bidimensionais (2D), foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos DRX-500 e DPX-300, operando nas frequências de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13, respectivamente. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo 17-A, acoplado a cromatógrafo de gás-líquido Shimadzu, modelo GC-MS – QP5050A. Os espectros de massas de alta resolução foram registrados em espectrômetro modelo LCMS-IT-TOF, equipado com fonte de ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo. Nas cromatografias de adsorção em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 como fase estacionária. Na eluição cromatográfica usou-se os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em gradiente de crescente polaridade. As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre poliéster. A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em λ_{max} 254 e 365 nm, utilizando lâmpada, e/ou pela aspensão com solução de vanilina seguida de aquecimento.

2.2 Material vegetal

As cascas do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* foram coletadas no município de Apodi-RN. A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo Professor Afrânio Gomes Fernandes. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará sob o número 14923.

2.3. Extração e isolamento dos constituintes

As cascas do caule (2,098 Kg) foram secas à temperatura ambiente, trituradas e extraídas com hexano e, em seguida, com etanol, obtendo-se, após concentração 40 g e 60 g, respectivamente. O extrato hexânico foi fracionado em coluna filtrante de gel de sílica sob vácuo, obtendo-se quatro frações eluídas com hexano (4,32 g), CH₂Cl₂ (1,41 g), AcOEt (2,01 g) e MeOH (675 mg).

A fração CH₂Cl₂ (1,4 g) do extrato hexânico foi adsorvida em gel de sílica, submetida à coluna filtrante eluindo-se com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se um total de 121 frações de 10 mL cada. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 22-25 (25 mg), eluída com Hex:CH₂Cl₂ (6:4), foi identificada como o triterpeno 3β-*O*-nanoi-lupeol (**1**).^{7,17-18} A fração 29 (30 mg), eluída com Hex:CH₂Cl₂ (4:6), foi caracterizada como a mistura dos triterpenos 3-β-*O*-cinamoil-lupeol (**2**)⁷ e 3-β-*O*-diidrocinoil-lupeol (**3**).⁷ A fração 43-49 (79 mg), eluída com Hex:AcOEt (6:4), quando submetida a nova cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando hex, AcOEt e MeOH, em gradiente crescente de polaridade, forneceu na fração 19, eluída com Hex:AcOEt (9:1), 10 mg de um sólido que foi identificado como o triterpeno lupeol (**4**).¹⁹ O tratamento cromatográfico da fração 50-61 (144,5 mg), eluída com Hex:AcOEt (7:3), em coluna de gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, resultou na obtenção da fração 19-22, eluída com Hex:AcOEt (8:2), constituída de 10 mg de um sólido que foi caracterizada como a mistura dos esteróides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**).²⁰

A fração CH₂Cl₂ (6,03 g) do extrato etanólico foi adsorvida em gel de sílica, submetida à coluna filtrante, eluindo-se com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros e em misturas crescentes de polaridades (1:1), resultando nas frações Hex (31,3 mg); Hex: CH₂Cl₂ (1,3 g); CH₂Cl₂ (898 mg); CH₂Cl₂:AcOEt (2,96 g); AcOEt (413 mg); AcOEt:MeOH (1,34 g) e MeOH (72,2 mg). Uma alíquota da fração Hex: CH₂Cl₂ (1,10 g) foi adsorvida em gel de sílica, submetida à coluna filtrante eluindo-se com misturas de hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se um total de 97 frações de 10 mL. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 40-41 (90 mg), eluída com Hex:AcOEt (7:3), foi identificada como um composto tricíclico benzociclohepteno, o bis-nor-diterpeno deoxofavelina (**7**).⁸ A fração 24-35 (850 mg), eluída com Hex:AcOEt (9:1), foi submetida a novo tratamento

cromatográfico em gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se na fração 49, eluída com Hex:AcOEt (7:3), 10 mg do composto identificado como o tricíclico benzociclohepteno, o bis-nor-diterpeno favelina metil éter (**8**).^{7,8}

2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados

3 β -O-nanoil-lupeol (1) Sólido branco; p.f.: 131-133 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 2850; 2919; 1734; 1639; 1009; RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 14,2 (CH₃-9'); 14,6 (CH₃-27); 16,1 (CH₃-26); 16,2 (CH₃-25); 16,6 (CH₃-24); 18,1 (CH₃-28); 18,3 (CH₂-6); 19,5 (CH₃-30); 21,0 (CH₂-11); 22,4 (CH₂-8'); 23,8 (CH₂-2); 24,9 (CH₂-12); 25,2 (CH₂ 3'); 27,5 (CH₂-15); 28,1 (CH₃-23); 29,9 (CH₂-21); 29,9 (CH₂-4'); 29,9 (CH₂-5'); 29,9 (CH₂-6'); 31,4 (CH₂-7'); 34,3 (CH₂-7); 34,9 (CH₂-16); 35,7 (CH₂ 2'), 37,3 (C-10); 38,1 (CH-13); 38,5 (CH₂-1); 38,1 (C-4); 40,1 (CH₂-22); 41,1 (C-8); 43,1 (C-14); 43,7 (C-17); 48,1 (CH-19); 48,4 (CH-18); 50,4 (CH-9); 55,5 (CH-5); 80,8 (CH-3); 109,4 (CH₂-29); 151,1 (C-20); 173,8 (C-1'); EM-ESI *m/z* 565,4162 [M-H]⁻ (C₃₉H₆₅O₂, calc *m/z* 565,4984)

3- β -O-cinamoil-lupeol (2) Sólido branco; p.f.: 196-199 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 2938; 2864; 1706; 1600; 1450; 1641; 1000; RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 14,2 (CH₂-27); 16,0 (CH₂-26); 16,3 (CH₂-25); 16,7 (CH₂-24); 18,1 (CH₂-28); 18,3 (CH₂-6); 19,4 (CH₂-30); 21,0 (CH₂-11); 23,9 (CH₂-2); 25,2 (CH₂-12); 27,6 (CH₂-15); 28,1 (CH₃-23); 29,9 (CH₂-21); 34,2 (CH₂-7); 35,7 (CH₂-16); 37,2 (C-10); 37,8 (C-4); 38,1 (CH-13); 38,5 (CH₂-1); 40,1 (CH₂-22); 41,9 (C-8); 43,2 (C-14); 43,0 (C-17); 43,3 (CH-18); 48,1 (CH-19); 50,4 (CH-9); 55,5 (CH-5); 81,1 (CH-3); 109,5 (CH₂-29); 119,0 (C-8'); 128,1 (CH 2'/CH-6'); 128,9 (CH 3'/CH-5'); 130,9 (CH-4'); 134,7 (C-1'); 151,1 (C-20); 144,4 (C-7'); 167,0 (C-9'); EM-ESI *m/z* 579,4203 [M+Na]⁺ (C₃₉H₅₆NaO₂, calc *m/z* 579,4178)

3- β -O-diidrocinamoil-lupeol (3) Sólido branco; p.f.: 196-199 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 2938; 2864; 1706; 1600; 1450; 1641; 1000; RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 14,6 (CH₃-27); 16,0 (CH₃-26); 16,2 (CH₃-25); 16,8 (CH₃-24); 18,1 (CH₃-28); 18,1 (CH₂-6); 19,4 (CH₃-30); 21,0 (CH₂-11); 23,7 (CH₂-2); 25,2 (CH₂-12); 27,6 (CH₂-15); 27,9 (CH₃-23); 29,9 (CH₂-21); 31,2 (CH₂-7'); 34,4 (CH₂-7); 35,3 (CH₂-16); 36,4 (CH₂-8'); 37,3 (C-10); 37,9 (C-4); 38,1 (C-13); 38,4 (CH₂-1); 40,1 (CH₂-22); 41,9 (C-8); 43,1 (C-14); 43,0 (C-17); 43,3 (CH-18); 48,1 (CH-

19); 50,4 (CH-9); 55,5 (CH-5); 81,1 (CH-3); 109,5 (CH₂-29); 126,2 (C 2'/CH-6'); 126,2 (C-4'); 128,3 (C-4'); 128,5 (CH-3'/CH-5'); 140,7 (C-1'); 151,1 (C-20); 172,8 (C-9'); EM-ESI *m/z* 581,4349 [M+Na]⁺ (C₃₉H₅₈NaO₂, calc *m/z* 581,4334)

Lupeol (4) Sólido branco amorfo; p.f.: 210-212 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3393; 2922; 2852; 1038; 1640; RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 14,8 (CH₃-27); 15,6 (CH₃-24); 16,2 (CH₃-26); 16,3 (CH₃-25); 18,2 (CH₃-28); 18,5 (CH₂-6); 19,5 (CH₃-30); 21,2 (CH₂-11); 25,4 (CH₂12); 27,6 (CH₂-2); 27,7 (CH₂-15); 28,2 (CH₃-23); 30,1 (CH₃-21); 34,5 (CH₂-7); 35,8 (CH₂-16); 37,4 (C-10); 38,3 (C-13); 38,9 (CH₂-1); 39,1 (C-4); 40,2 (CH₂-22); 41,1 (C-8); 43,1 (C-14); 43,2 (C-17); 48,2 (CH-19); 48,5 (CH-18); 50,7 (CH-9); 55,5 (CH-5); 79,2 (CH-3); 109,5 (CH₂-29); 151,2 (C-20).

Deoxofavelina (1H-Dibenzo[*a,d*]ciclohepten-7-ol, 2,3,4,10,11,11a-hexaidro-1,1,8-trimetila (7). Sólido branco; p.f.: 149-151 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 2925; 2863; 1650; 3378; EM-IE *m/z* 256 ([M]⁺); RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, Tabela 1).

Favelina metil éter (10H-Dibenzo[*a,d*]ciclohepten-10-ona, 1,2,3,4,11,11a-hexaidro-7-metoxi-1,1,8-trimetil (8). Sólido branco; p.f.: 135-136 °C; IV (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 2922; 2853; 1670; 1602; 1462; 1058; EM-IE *m/z* 284 ([M]⁺); RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, Tabela 1).

2.5. Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram HL60 (leucemia pro-mielocítica), MCF-7 (carcinoma da mama) e NCIH292 (câncer de pulmão) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). As células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Analisou-se a citotoxicidade dos compostos contra todas as três linhagens celulares tumorais, utilizando 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis). A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm (DTX 880 multimodo, Beckman Coulter, Inc., Fullerton).

As linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL e a de HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de $0,3 \times 10^6$.

Os compostos **1**, **7**, **8** e a mistura de **2** e **3** foram previamente dissolvidos em DMSO estéril foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazólio), e as placas foram incubadas por 3 h. Decorrido este período, a absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os valores de CI₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança foram obtidos por regressão não linear usando o programa *Graphpad Prism*, versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, California, Estados Unidos). Cada amostra foi testada em duplicata. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reinvestigação fitoquímica do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* resultou no isolamento e identificação de 3β-*O*-nanoi-lupeol (**1**),^{7,17-18} na mistura dos triterpenos 3-β-*O*-cinamoi-lupeol (**2**)⁷ e 3-β-*O*-diidrocinaoi-lupeol (**3**),⁷ lupeol (**4**)¹⁹ e na mistura dos esteróides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**).²⁰ Do extrato etanólico da casca do caule foram isolados e identificados os bis-nor-diterpenos deoxofavelina (**7**)⁸ e favelina metil éter (**8**)^{7,8} (Figura 1). As estruturas destes metabólitos foram elucidadas através da análise dos dados espectrais 1D de RMN ¹H, RMN¹³C ({}¹H}- e DEPT 135°) e 2D ¹H-¹H-COSY e interação heteronuclear de átomos de hidrogênio e carbono HSQC (¹J_{CH}) e HMBC (ⁿJ_{CH}, n=2 e 3) envolvendo comparação com dados da literatura.

O espectro de massa de alta resolução de **1**, obtido através da ionização por eletrospray (ESI) no modo no modo negativo forneceu o pico correspondente ao íon molecular em *m/z* 565,4162 [M-H]⁻ compatível com a fórmula molecular C₃₉H₆₆O₂ (C₃₉H₆₅O₂, calc *m/z* 565,4984). O espectro de RMN ¹³C exibiu os mesmos sinais da unidade triterpênica de derivados acilados do lupeol.^{7,17,18} Sinais adicionais foram observados em δ_C 173,8 atribuído à presença de carbono de carbonila de éster (C-1'), que foi confirmada pela banda de absorção em ν_{max} 1734 cm⁻¹ no infravermelho; em δ_C 22,4 (CH₂-8'), 25,2 (CH₂-3'), 29,9 (CH₂-4',

CH₂-5' e CH₂-6'), 31,4 (CH₂-7') e 35,7 (CH₂-2'), atribuídos a átomos de carbono metilênicos, e em δ_C 14,2 a carbono metílico.

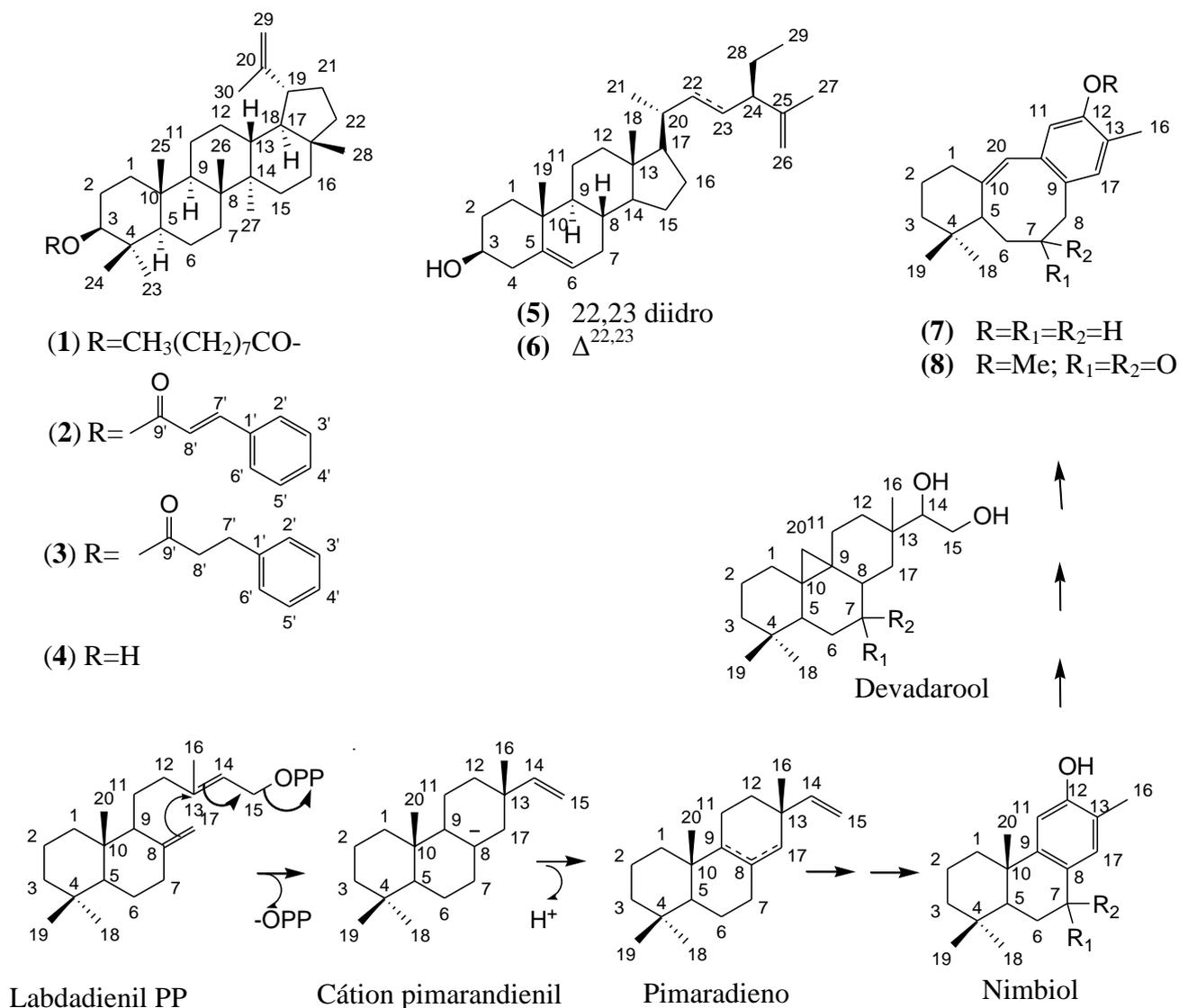


Figura 1. Metabólitos secundários isolados de *Cnidoscopus phyllacanthus* e cogitação de rota biogenética para formação de 7 e 8.

A numeração dos carbonos 7 e 8 respeita as suas origens biossintéticas, como observado em outras referências,²¹ sendo CH-14 substituído por CH-17, diferente da utilizada por Yuichi e coautores.⁸ Tal numeração,⁸ diferente das demais registradas na literatura, foi também usada para incluir a Tabela 1 novamente neste artigo.

O espectro de RMN ^1H mostrou um tripleto em δ_{H} 2,29 ($J = 6,7$ Hz) referente aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono metilênico $\text{CH}_2\text{-}2'$ α ao grupo carbonila. Estas deduções, juntamente com a análise dos espectros 2D HSQC e HMBC permitiram identificar a substância **1** como 3- β -*O*-nanoil-lupeol (**1**), previamente reportada em *Plumeria rubra*.²²

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e de ^{13}C dos componentes de uma mistura de **2** e **3**, juntamente com a comparação com dados registrados na literatura⁷ permitiram identificar estes compostos como 3- β -*O*-cinamoil-lupeol (**2**) e 3- β -*O*-diidrocinamoil-lupeol (**3**), mistura já isolada desta espécie.⁷ A ocorrência de **1**, **2** e **3** em *C. phyllacanthus*, juntamente com a presença de **2**, 3- β -*O*-acetil-lupeol e 3- β -*O*-fenilpropanoil-lupeol) em *Cnidoscolus elasticus*,^{17,23} de **2**, **3**, 3- β -*O*-acetil-lupeol e 3- β -*O*-hexanoil-lupeol em *Cnidoscolus vitifolius*¹⁸ e de 3- β -*O*-acetil-lupeol em *Cnidoscolus urens*²⁴ sugerem que estes derivados acilados do lupeol podem ser usados marcadores quimiotaxômicos deste gênero.

O triterpeno lupeol (**4**) e a mistura dos esteróides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**) foram identificados através da análise de dados fornecidos por métodos espectroscópicos e comparação com a literatura.^{19,20}

O composto (**7**) mostrou o pico do íon molecular em m/z 256 $[\text{M}]^+$ no espectro EM-IE, que em combinação com os dados de RMN ^1H e ^{13}C permitiu a dedução da fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$. O espectro na região do infravermelho de **7** apresentou banda em ν_{max} 3378 e em 1550 cm^{-1} compatíveis com a presença de hidroxila fenólica e anel aromático, respectivamente. A presença de dois singletos em δ_{H} 6,56 (H-11) e 6,78 (H-17) no espectro de RMN ^1H do composto (**7**) sugeriu a presença de átomos de hidrogênios em posição *para* em anel aromático tetrassubstituído. Os singletos em δ_{H} 0,72 (3H-19)/ δ_{C} 15,4 (CH_3 -19), 1,00 (3H-18)/ δ_{C} 30,5 (CH_3 -18) e 2,21 (3H-16)/ δ_{C} 20,5 (CH_3 -16) foram atribuídos a três grupos metila, sendo dois grupos ligados a átomos de carbono sp^3 quaternários e um ligado a carbono sp^2 ; enquanto o sinal em δ_{H} 6,26 (s)/ δ_{C} 124,9 sugeriu a presença de hidrogênio ligado a carbono olefínico. A análise dos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 1), revelou 18 linhas espectrais: seis carbonos não hidrogenados (um sp^3 e cinco sp^2 incluindo um ligado a átomo de oxigênio em δ_{C} 151,7 (C-12), quatro metínicos (um sp^3 e três sp^2), cinco metilênicos (todos sp^3) e três metílicos = $(\text{C})_5(\text{C}-\text{O})(\text{CH})_4(\text{CH}_2)_5(\text{CH}_3)_3 = \text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O} + \text{H}$ de OH = $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$, de acordo com a fórmula molecular deduzida com base no espectro de massas, correspondendo a sete graus de insuficiência (quatro de um anel aromático, uma ligação dupla e dois ciclos). Assim, os dados discutidos, juntamente com a análise dos dados de RMN 2D HSQC e HMBC (Tabela 1) e comparação com valores descritos na literatura⁸ permitiram caracterizar a

estrutura como o bis-nor-diterpeno deoxofavelina (**7**), metabólito secundário já isolado desta espécie.^{7,8}

O espectro na região do infravermelho de **8** apresentou bandas características de carbonila em sistema α,β -insaturado. O espectro de massas EM-IE apresentou o pico do íon molecular em m/z 284 compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{24}O_2$. O espectro de RMN 1H de **8** apresentou além dos singletos, que foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono aromáticos (δ_H 6,59/ δ_C 113,1, CH-11, e 7,63/ δ_C 131,4, CH-17, maior δ_H revelando efeito anisotrópico do grupo carbonila em posição *orto*), aos átomos de hidrogênio dos grupos metila (δ_H 0,76/ δ_C 20,9, 1,13/ δ_C 29,1 e 2,19/ δ_C 15,7, correspondentes aos CH_3 -19, CH_3 -18 e CH_3 -16, respectivamente) e do hidrogênio ligado ao carbono olefínico (δ_H 6,30); sinais adicionais em δ_H 3,88 (s, MeO) e em δ_H 3,02 (d, $J = 5,6$ Hz, MeO) que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio de uma metoxila e de átomos de hidrogênio ligados ao carbono metilênico α ao grupo carbonila conjugado, respectivamente. A estrutura de **8** foi inequivocamente confirmada através da análise dos espectros HMQC e HMBC (Tabela 1). A comparação desses dados com valores de RMN 1H e ^{13}C registrados na literatura permitiram identificar a metil-*O*-deoxofavelina (**8**), um bis-nor-diterpeno também já identificado nesta espécie.^{7,8}

Postulação de rota biossintética para a bioprodução dos diterpenos **7** e **8** pode envolver a sequência sumarizada na Figura 1, justificando-se a formação do anel de sete membros através de anel ciclopropânico formado do grupo 20 e os carbonos 9 e 10 como verificado no devadarool (Figura 1), e a eliminação dos átomos de carbono CH_2 -14 e CH_2 -15.

Tabela 1. Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de **7** e **8**, incluindo-se resultados fornecidos pelas experiências 2D HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono-13 (δ_{C}) em ppm e constantes de acoplamento (J entre parênteses) em Hz.*

	7			8				
	HSQC δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$	HSQC δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$
C								
4	36,9	-	3H-16; 3H-17		38,5	-	3H-16; 3H-17	2H-8
7	-	-	-		201,4	-		
8	135,4	-			129,9	-		H-4; 2H-8
9	135,6	-	-		136,4	-		
10	145,2	-	1H-9	2H-13	147,8	-		2H-8
12	151,7	-	1H-4	1H-1; 3H-18	160,9	-	H-4	3H-19; 3H-18
13	121,1	-	3H-18	1H-4	124,9	-	3H-18	H-4
CH								
5	55,1	2,27 (m)	1H-11	2H-7; 2H-14; 3H-16	51,4	2,37 (d, 5,6)	2H-8	3H-16; 3H-17
11	116,8	6,56 (s)		1H-11	113,1	6,59 (s)		
17	130,5	6,78 (s)		3H-18	131,4	7,63 (s)		3H-18
20	124,9	6,26 (s)		1H-4	125,7	6,3 (s)		H-4
CH₂								
1	41,3	2,38 (m)		1H-11	40,3	2,31 (d, 5,3)		
2	24,6	1,64 (m)			25,2	1,67 (m)		
3	42,5	1,40 (m)		3H-16; 3H-17	43,2	1,46 (m)		3H-17; 3H-17
6	30,4	1,48 (m)	2H-7		42,7	3,02 (d, 5,6)		
7	32,8	2,59 (m)	1H-1		-	-	-	-
CH₃								
16	15,4	2,21 (s)		1H-1	15,7	2,19 (s)		
18	30,5	1,00 (s)	-	2H-14; 3H-16	29,1	1,13 (s)	-	3H-16
19	20,5	0,72 (s)		2H-14; 3H-17	20,9	0,76 (s)		3H-17
MeO	-	-	-	-	55,5	3,88 (s)	-	-

Análise comparativa dos espectros $\{^1\text{H}\}$ - e DEPT 135°. RMN ^{13}C foi usada para reconhecer os sinais de C, CH, CH₂ e CH₃. O espectro 2D ^1H - ^1H -COSY foi também nas atribuições dos sinais de hidrogênio

Os compostos **1**, **7**, **8** e a mistura de **2** e **3** foram submetidos ao ensaio com MTT²⁵ para avaliação dos seus efeitos citotóxicos em linhagens celulares HL-60 (leucemia pro-mielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) (Tabela 2). O composto **7** foi o mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de CI_{50} variando de 2,7 a 8,9 $\mu\text{g/mL}$. É válido acrescentar que o bis-nor-diterpeno (**8**) foi seletivo para células de leucemia (CI_{50} 1,6 $\mu\text{g/mL}$), uma vez que mostrou uma atividade

fraca nas células de diferentes origens histológicas. O resultado destes testes corroboram com os resultados obtidos previamente por Endo e colaboradores,⁸ que relataram atividade citotóxica dos bis-nor-diterpenoides **7** e **8** em linhagens celulares de leucemia em murinos (P-388).

Tabela 2. Concentração inibitória em 50% (CI₅₀%) e intervalo de confiança (IC) das amostras em três linhagens tumorais

Compostos	HL-60 ^a	MCF-7 ^b	NCI-H292 ^c
	CI ₅₀ (µg/mL) (Intervalo de Confiança)		
1	15,6 (10,9 – 22,3)	>25	>25
2/3	>25	>25	>25
7	2,7 (1,6 – 4,5)	8,9 (6,3 – 12,6)	3,1 (2,2 – 4,3)
8	1,6 (1,3– 2,1)	>25	10,5 (7,2 – 15,2)
Doxorubicina	0,02 (0,01 – 0,02)	0,3 (0,2 – 0,5)	0,2 (0,1 – 0,5)

^aLeucemia pro-mielocítica humana, ^bAdenocarcinoma de mama humano e ^cCarcinoma de pulmão humano

CONCLUSÃO

Da casca do caule de *C. phyllacanthus* foram isolados quatro triterpenos, a mistura de dois esterides e dois bis-nor-diterpenos. Dentre os triterpenos isolados pode-se destacar o 3β-O-nanoil-lupeol (**1**), cujo isolamento está sendo descrito pela primeira vez nesta espécie. O isolamento de derivados acilados do lupeol em espécies de *Cnidocolus* reforça a importância deste tipo de compostos como possíveis quimiomarcadores para o gênero. A atividade citotóxica observada, principalmente, pelo bis-nor-diterpeno **7** pode levar ao desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

REFERÊNCIAS

- ¹ De Melo, A. L.; De Sales, M. F. O Gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **2008**, *22*, 806. [\[CrossRef\]](#)
- ² Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.; *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*, 2ª. ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, SP, 2008.
- ³ Silva, G. L. S.; Silva, A. M. A.; Nóbrega, G. H.; Azevedo, S. A.; Filho, J. M. P.; Mendes, R. S. Efeito da Inclusão de Fontes Lipídicas na Dieta de Cabras em Lactação sobre os Parâmetros Sanguíneos. *Ciências e Agrotecnologia* **2010**, *34*, 233. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴ Matos, F. J. A.; Lorenzi, H.; Dos Santos, L. F. L.; Matos, M. E. O.; Silva, M. G. V.; De Sousa, M. P.; *Plantas Tóxicas: Estudo de Fitotoxicologia Química de Plantas Brasileiras*, 1ª. ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, SP, 2011.
- ⁵ Oliveira, D. M.; Pimentel, L. A.; Araújo, J. A. S.; Medeiros, R. M. T.; Dantas, A. F. M.; Riet-Correa, F. Intoxicação por *Cnidoscolus phyllacanthus* (Euphorbiaceae) em Caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2008**, *28*, 36. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶ Ventura, M. M.; Lima, I. H. The Nonnitrogenous Constituents in Oily Seeds. I. Free Amino Acids in Mature Seeds of the Favela Tree. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **1959**, *31*, 191. [\[Link\]](#)
- ⁷ De Lemos, T. L. G.; Silveira, E. R.; Oliveira, M. F.; Braz Filho, R.; Hufford, D. Terpenoids from *Cnidoscolus phyllacanthus* Pax et Hoff. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1991**, *2*, 105. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Favelines, Novel Tricyclic Benzocycloheptenes with Cytotoxic Activities from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 3083. [\[CrossRef\]](#)
- ⁹ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Structures of Novel Cytotoxic Compounds from Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1991**, *33*, 425. [\[Link\]](#)
- ¹⁰ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Favelanone, a Novel Tetracyclic Cyclopropane Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 5555. [\[CrossRef\]](#)
- ¹¹ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Neofavelanone, a Novel Tetracyclic Cyclobutene Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 353. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Ohta, T.; Endo, Y.; Kikucki, R.; Kabuto, C.; Harada, N.; Nozoe, S. Absolute Stereochemistry of Benzocycloheptenone Derivatives from *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron* **1994**, *19*, 5659. [\[CrossRef\]](#)

- ¹³ Ohta, T.; Endo, Y.; Kikucki, R.; Kabuto, C.; Nozoe, S. Faveloxide, a New Isoprenoid Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Heterocycles* **1994**, *38*, 55. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Sítio da World Health Organization. Disponível em: http://who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/. Acesso em: 28 agosto 2014.
- ¹⁵ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa/2014 – Incidência de Câncer No Brasil*, INCA: Rio de Janeiro, 2014.
- ¹⁶ Newman, D.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, **2012**, *75*, p. 311. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Caballero, P.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Fernandez, S.; Hernandez, E. The Isolation and Molecular Structure of Lupeol α -Phenylpropionate from *Cnidoscolus elasticus*. *Journal of Natural Products* **1984**, *47*, 819. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Brum, R. L.; Honda, N. K.; Hess, S. C.; Cavalheiro, A. J.; Monache, F. D. Acyl Lupeols from *Cnidoscolus vitifolius*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1127. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁹ Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁰ Facundo, V. A.; Polli, A. R.; Rodrigues, R. V.; Militão, J. S. L. T.; Stabelli, R. G.; Cardoso, C. T. Constituintes Químicos Fixos e Voláteis dos Talos e Frutos de *Piper tuberculatum*. *Acta Amazônica* **2008**, *38*, 733. [\[CrossRef\]](#)
- ²¹ Ara, I.; Siddiqui, B. S.; Faizi, S.; Siddiqui, S. Tricyclic diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products* **1988**, *51*(6), 1054. [\[CrossRef\]](#)
- ²² Sengab, A. N.; Meselhey, K. M.; Fahmy, H. A.; Sleem, A. A. Phytochemical and Biological Studies of *Plumeria rubra* L. variety *acutifolia* grown in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)* **2009**, *47*, 147. [\[Link\]](#)
- ²³ Dominguez, X. A.; Franco, R.; Garcia, S.; Pugliese, O.; Santoyo, A. Lupeol Esters Isolated from Latex of Chilte (*Cnidoscolus elasticus* Lundell). *Revista Latinoamericana de Química* **1982**, *13*, 82. [\[Link\]](#)
- ²⁴ Bhattacharyya, J.; Barros, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscolus urens*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 274. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁵ Mossman, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55. [\[CrossRef\]](#)