



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

**Estudo Químico e Biológico de *Croton
regelianus* var. *matosii* (Euphobiaceae)**

Maria da Conceição de Menezes Torres

Fortaleza-CE 2008

Maria da Conceição de Menezes Torres

**Estudo Químico e Biológico de *Croton
regelianus* var. *matosii* (Euphobiaceae)**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Otília Deusdênia Loiola Pessoa

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). Francisco Arnaldo Viana

Fortaleza-CE 2008

T643e Torres, Maria da Conceição de Menezes
Estudo químico e biológico de *Croton regelianus* var. *matosii*
(Euphorbeaceae) / Maria da Conceição de Menezes Torres, 2008.
179f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Arnaldo Viana

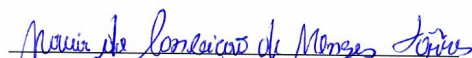
Área de concentração: Química Orgânica

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

1. *Croton regelianus* 2. Terpenóides 3. Esteróides 4. Cumarina
5. Atividade biológica I. Pessoa, Otília Deusdênia Loiola (orient.)
II. Viana, Francisco Arnaldo (co-orient.) III. Universidade Federal do
Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica IV. Título

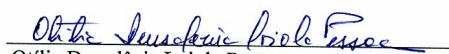
CDD 547


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

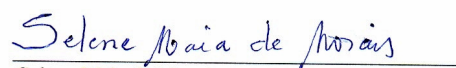

Maria da Conceição de Menezes Tôres

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 14/02/2008

EXAMINADORES:


Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará - UFC


Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará - UFC


Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará - UECE

“O estudo científico não é nada mais do que um refinamento do que pensamos todos os dias”.

Albert Einstein

A Deus, por todas as conquistas e alegrias vividas.

Aos meus pais, Eronildes e Francineide, e as minhas irmãs Edinalva e Júlia, pelo amor, dedicação, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A professora Otília Deusdênia L. Pessoa, pela orientação, dedicação e amizade, bem como pelas oportunidades concedidas para o meu aperfeiçoamento acadêmico, as quais têm me permitido acessar novos campos de estudo.

Ao professor Francisco Arnaldo Viana do Departamento de Químico (UERN), por ter me ajudado a dar os primeiros passos no laboratório, pela co-orientação, que foi de extrema importância para realização deste trabalho, pela amizade e por ter, juntamente com o professor Jaécio Carlos Diniz (UERN), me repassado parte do seu conhecimento sobre uma importante técnica analítica (HPLC).

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela amizade, contribuição com as coletas de plantas e por conceder a realização dos espectros de RMN dos compostos isolados.

Ao professor Raimundo Braz-Filho por sua amizade e pela grande ajuda na elucidação estrutural das substâncias isoladas.

À professora Letícia Veras Costa Lotufo e ao Daniel Pereira Bezerra, aluno de doutorado do curso de Farmacologia (UFC), pelos ensaios farmacológicos dos óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas.

Aos professores Manoel Andrade Neto e Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, pela realização dos testes de atividade nematocida e larvicida, respectivamente.

Ao professor Norberto Peporini Lopes (USP – Ribeirão Preto) pela realização dos espectros de massa de alta resolução, imprescindíveis para elucidação estrutural das substâncias isoladas que estão sendo relatadas pela primeira vez na literatura.

Aos professores do curso de pós-graduação em Química Orgânica (UFC) pela contribuição indispensável a minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Curso de pós-graduação em Química Orgânica (UFC): Célia, Lana, Mundinha e Sr. Paulo, pela valiosa contribuição no suporte técnico.

Aos operadores dos aparelhos de Infravermelho (João Henrique, Gustavo, Glauber e Luciana Bertini), de Cromatografia Gasosa (João Carlos, Sammy e Arthur) e de Ressonância Magnética Nuclear (Daniel, Renata, João Henrique, e Edângelo) pela obtenção dos espectros.

A todos os colegas de laboratório pela amizade e convívio durante o curso.

Às amigas Isabel, Julieta, Milena e Simone, pela amizade, carinho, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

As instituições CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP, PRONEX pelo suporte financeiro ao curso de pós-graduação. Em particular ao CNPq pela bolsa de pesquisa concedida, proporcionando maior tempo de dedicação à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xii
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE SIGLAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1- Considerações botânicas	5
1.1- Considerações sobre a família <i>Euphorbiaceae</i>	4
1.2- Considerações sobre o gênero <i>Croton</i>	6
1.3-Considerações sobre o <i>Croton regelianus</i>	7
CAPÍTULO 2- Revisão bibliográfica sobre o gênero <i>Croton</i> no Brasil	8
2.1- O gênero <i>Croton</i> no Brasil: constituintes químicos e atividades biológicas..	8
CAPÍTULO 3- Determinação estrutural	23
3.1- Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de <i>C. regelianus</i>	23
3.2 – Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de <i>C. regelianus</i> ...	33
3.2.1 – Determinação estrutural dos terpenos	33
3.2.1.1- Determinação estrutural de CRB-1 (128)	33
3.2.1.2- Determinação estrutural de CRFH-2 (130)	40
3.2.1.3- Determinação estrutural de CRFH-4 (131)	44
3.2.1.4- Determinação estrutural de CRTH-4 (132)	55
3.2.1.5- Determinação estrutural de CRTE-2 (133)	67
3.2.1.6- Determinação estrutural de CRTE-2Ac (134)	77
3.2.2- Determinação estrutural dos esteróides	81
3.2.2.1- Determinação estrutural de CRTH-3 (135 e 136)	81

3.2.2.2- Determinação estrutural de CRFH-3 (137)	92
3.2.2.3- Determinação estrutural de CRFE-2 (138)	96
3.2.3- Determinação estrutural de cumarina	100
3.2.3.1- Determinação estrutural de CRTE-1 (139)	100
3.2.4- Determinação estrutural de CRFH-1 (140)	113
CAPÍTULO 4- Parte experimental	116
4.1- Métodos cromatográficos	116
4.1.1- Cromatografia de adsorção	116
4.1.2- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	117
4.2- Métodos físicos	117
4.2.1- Ponto de fusão	117
4.2.2- Espectrometria de massa	117
4.2.3- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	118
4.2.4- Espectroscopia na região de absorção do infravermelho (IV)	119
4.2.5- Rotação óptica	119
4.2.6- Índice de refração.....	119
4.3- Estudo dos constituintes químicos voláteis das folhas de <i>Croton regelianus</i>	119
4.3.1- Material vegetal	119
4.3.2- Método de análise	120
4.3.3- Obtenção dos óleos essenciais A e B das folhas de <i>C. regelianus</i>	120
4.3.4- Fracionamento cromatográfico de OEFCR-B e isolamento de CR-B1	121
4.4 - Estudo dos constituintes fixos de <i>C. regelianus</i>	122
4.4.1- Preparação dos extratos	122
4.4.3- Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>C. regelianus</i> (CRFH).....	123
4.4.3.1- Fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ CL ₂ (CRFH-D).....	124
4.4.3.2- Fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D2 e isolamento de CRFH-1 e CRFH-2	125
4.4.3.3- Fracionamento cromatográfico de CRFH-D3 e isolamento de CRFH-3	126
4.4.3.4- Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt proveniente do extrato hexânico das folhas (CRFH-A)	127

4.4.3.5- Fracionamento cromatográfico de CRFH-A3 e isolamento de CRFH-4	128
4.4.4- Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>C. regelianus</i> (CRFE) .	131
4.4.4.1- Fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ (CRFE-D) do extrato EtOH das folhas e isolamento de CRFE-1 e CRFE-2	131
4.4.5- Fracionamento preliminar do extrato hexânico dos talos de <i>C. regelianus</i> (CRTH)	135
4.4.5.1- Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos (CRTH-A)	135
4.4.5.2- Fracionamento cromatográfico de CRTH-A2 e isolamento de CRTH-3 e CRTH-4, (Fluxograma 5, pág. 97)	136
4.4.6- Fracionamento do extrato etanólico dos talos de <i>C. regelianus</i> (CRTE)..	140
4.4.6.1- Fracionamento cromatográfico da fração CRTE-D e isolamento de CRTE-1 e CRTE-2	140
4. 5- Modificação estrutural do composto CRTE-2	144
CAPÍTULO 5- Estudo do potencial biológico de <i>C. regelianus</i>	145
5.1- Avaliação do potencial larvicida e nematicida dos óleos essenciais de <i>C. regelianus</i>	145
5.1.1- Considerações sobre o fitonematóide <i>Meloidogyne incognita</i>	145
5.1.2- Considerações sobre as larvas de <i>Artemia</i> sp.	146
5.1.3- Considerações sobre o mosquito transmissor da dengue, <i>Aedes aegyptis</i> ...	146
5.1.4- Ensaio das atividades larvicida e nematicida do óleo essencial e do seu constituinte majoritário, o ascaridol	147
5.1.5 – Resultados e discussão	148
2.2- Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial, extratos, frações e substâncias isoladas de <i>C. regelianus</i>	149
2.2.1- Considerações sobre o câncer	150
2.2.2- Atividade citotóxica <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais	150
2.2.3- Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	151
2.2.4- Investigação da atividade citotóxica do óleo essencial e de seu constituinte majoritário, o ascaridol	152
2.2.5- Investigação bioguiada preliminar dos extratos e frações	154

CAPÍTULO 6 - Conclusões	158
CAPÍTULO 7 - Constantes físicas e dados espectroscópicos	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Fotografia de <i>C. regelianus</i> , com detalhes das folhas e inflorescências	7
Fig. 2- Cromatograma do óleo essencial A das folhas de <i>C. regelianus</i>	26
Fig. 3- DIC do óleo essencial A das folhas de <i>C. regelianus</i>	26
Fig. 4- Cromatograma do óleo essencial B das folhas de <i>C. regelianus</i>	27
Fig. 5- DIC do óleo essencial B das folhas de <i>C. regelianus</i>	27
Fig. 6- Espectro de massa do triciclono (110)	28
Fig. 7- Espectro de massa do α -tujeno (111)	28
Fig. 8- Espectro de massa do α -pineno (112)	28
Fig. 9- Espectro de massa do canfeno (113)	28
Fig. 10- Espectro de massa do β -pineno (114)	29
Fig. 11- Espectro de massa do mirceno (115)	29
Fig. 12- Espectro de massa do α -felandreno (116)	29
Fig. 13- Espectro de massa do α -terpineno (117)	29
Fig. 14- Espectro de massa do <i>p</i> -cimeno (118)	30
Fig. 15- Espectro de massa do limoneno (119)	30
Fig. 16- Espectro de massa do 1,8-cineol (120)	30
Fig. 17- Espectro de massa do γ -terpineno (121)	30
Fig. 18- Espectro de massa do terpinoleno (122)	31
Fig. 19- Espectro de massa do linalool (123)	31
Fig. 20- Espectro de massa da cânfora (124)	31
Fig. 21- Espectro de massa do isoborneol (125)	31
Fig. 22- Espectro de massa do 4-terpineol (126)	32
Fig. 23- Espectro de massa do α -terpineol (127)	32
Fig. 24- Espectro de massa do ascaridol (128)	32
Fig. 25- Espectro de massa do isoascaridol (129)	32
Fig. 26- Espectro de absorção na região do IV (NaCl, cm ⁻¹) de CRB-1 (128)	37
Fig. 27- Espectro de RMN ¹³ C-BB [75 MHz, CDCl ₃] de CRB-1 (128)	37
Fig. 29- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de CRB-1 (128)	38
Fig. 28- Espectro de massa de CRB-1 (128)	38
Fig. 30- Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃] de CRB-1 (128)	39
Fig. 31- Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C-HMBC [300 e 75 MHz, CDCl ₃] de CRB-1 (128) ..	39

Fig. 32- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (130)	42
Fig. 33- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CRFH-3 (130)	42
Fig. 34- Espectro de massa de CRFH-3 (130)	43
Fig. 35- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (130)	43
Fig. 36- Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm^{-1}) de CRFH-4 (131)	49
Fig. 37- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	49
Fig. 38- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	50
Fig. 39- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	50
Fig. 40- Espectro de RMN HMQC [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	51
Fig. 41- Espectro de RMN HMQC-expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	51
Fig. 42- Espectro de RMN HMBC [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	52
Fig. 43- Espectro de RMN HMBC-expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	52
Fig. 44- Espectro de RMN HMBC-expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	53
Fig. 45- Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)	53
Fig. 46- Espectro de RMN ^1H x ^1H - NOESY [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131) ...	54
Fig. 47- Espectro massa de CRFH-4 (131)	54
Fig. 48- Espectro de absorção na região do IV (NaCl, cm^{-1}) de CRTH-4 (132)	61
Fig. 49- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	61
Fig. 50- Espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	62
Fig. 51 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	62
Fig. 52- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	63
Fig. 53- Espectro HMBC- expansão [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	63
Fig. 54- Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	64
Fig. 55- Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	64
Fig. 56- Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY-expansão [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)	65
Fig. 57- EM-IES de CRTH-4 (132)	65
Fig. 58- EM/EM-IES de CRTH-4 (132)	66
Fig. 59- Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm^{-1}) de CRTE-2 (133)	72

Fig. 60- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	72
Fig. 61- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	73
Fig. 62 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	73
Fig. 63- Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	74
Fig. 64- Espectro HSQC-[500 e 125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	74
Fig. 65- Espectro de RMN ^1H , ^1H –COSY- [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	75
Fig. 66- Espectro de RMN ^1H , ^1H –NOESY- [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)	75
Fig. 67- Espectro de EM-IES de alta resolução de CRTE-2 (133)	76
Fig. 68- Espectro de EM/EM-IES de CRTE-2 (133)	76
Fig. 69- Espectro de absorção na região do IV (NaCl , cm^{-1}) de CRTE-2Ac (134)	79
Fig. 70- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CCl_3D] de CRTE-2Ac (134)	79
Fig. 71- Espectro de RMN ^{13}C [125 MHz, CCl_3D] de CRTE-2Ac (134)	80
Fig. 72- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CCl_3D] de CRTE-2Ac (134) ...	80
Fig. 73- Espectro de absorção na região do IV (NaCl cm^{-1}) de CRTH-3 (135 e 136)	87
Fig. 74- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)	87
Fig. 75- Espectro de RMN ^1H - expansão [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136).	88
Fig. 76- Espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)	88
Fig. 77- Espectro de RMN HMQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136) .	89
Fig. 78- Espectro de RMN HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136) .	89
Fig. 79- Espectro de RMN HMBC – expansão [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)	90
Fig. 80- Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)	90
Fig. 81- Espectro de RMN ^1H , ^1H - NOESY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)	91
Fig. 82- Espectro massa de CRTH-3 (135 e 136)	91
Fig. 83- Espectro de absorção na região do IV (KBr , cm^{-1}) de CRFH-3 (137)	94
Fig. 84- Espectro de RMN ^{13}C -CPD [75 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (137)	94
Fig. 85- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CRFH-3 (137)	95
Fig. 86- Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (137)	95
Fig. 87- Espectro de absorção na região do IV (KBr , cm^{-1}) de CRFE-2 (138)	98
Fig. 88- Espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, piridina- d_5] de CRFE-2 (138)	98
Fig. 89- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CRFE-2 (138)	99
Fig. 90- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, piridina- d_5] de CRFE-2 (138)	99

Fig. 91- Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm^{-1}) de CRTE-1 (139)	107
Fig. 92- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	107
Fig. 93- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	108
Fig. 94- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139) .	108
Fig. 95- Espectro de RMN ^1H , ^1H –COSY- [500 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139) ..	109
Fig. 96- Espectro de massa de CRTE-1 (139)	109
Fig. 97- Espectro HMQC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	110
Fig. 98- Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	110
Fig. 99- Espectro HMBC- expansão [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139) ..	111
Fig. 100- Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	111
Fig. 101- Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)	112
Fig. 102- Espectro de massa de CRFH-2 (140)	115
Fig. 103- Cromatograma da substância CRTH-3 (135 e 136)	138
Fig. 104- Cromatograma da substância CRTH-4 (132)	138
Fig. 103- Efeito do óleo essencial de <i>C. regelianus</i> e do ascaridol sobre o peso do tumor Sarcoma 180 transplantados em camundongos. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). Como controle positivo foi usado 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de oito animais. * ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls	153

LISTA DE TABELAS

Tab. 1- Atividades biológicas reportadas para plantas do gênero <i>Croton</i> do Brasil	9
Tab. 2- Ocorrência de alcalóides, flavonóides e terpenóides por espécie no gênero <i>Croton</i>	11
Tab. 3- Diterpenos isolados a partir de espécies do gênero <i>Croton</i> no Brasil.....	13
Tab. 4- Alcalóides isolados a partir de espécies do gênero <i>Croton</i> no Brasil.....	16
Tab. 5- Flavonóides isolados a partir de espécies do gênero <i>Croton</i> no Brasil.....	18
Tab. 6- Triterpenos presentes em espécies do gênero <i>Croton</i> no Brasil.....	19
Tab. 7- Esteróides isolados a partir de espécies gênero <i>Croton</i> no Brasil.....	21
Tab. 8- Outras substâncias isolados a partir de espécies do gênero <i>Croton</i> no Brasil....	21
Tab. 9- Composição química dos óleos essenciais das folhas do <i>C. regelianus</i>	25
Tab. 10- Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRB-1.....	34
Tab. 11- Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de CRB-1 com aqueles registrados na literatura para o ascaridol (Kiuchi <i>et al.</i> , 2002; Chang <i>et al.</i> , 1979	36
Tab. 12- Deslocamento químico (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3) de CRFH-2	41
Tab. 13- Padrão de hidrogenação determinado através de análise comparativa entre nos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° de CRFH-4	44
Tab. 14- Deslocamento químico (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de CRFH-4	48
Tab. 15- Padrão de hidrogenação determinado através da análise do espectro de RMN ^{13}C -APT.....	57
Tab. 16- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de CRTH-4.....	60
Tab. 17- Padrão de hidrogenação determinado através da análise dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRTE-2	67
Tab. 18- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOH) de CRTE-2.....	71
Tab. 19- Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de CRTE-2 e do seu derivado CRTE-2Ac (CDCl_3).....	78
Tab. 20- Padrão de hidrogenação determinado através de análise do espectro de RMN ^{13}C -APT de CRTH-3.....	82
Tab. 21- Dados de RMN ^{13}C e ^1H de CRTH-3 comparados com valores da literatura (Previtera <i>et al.</i> , 1990) usando CDCl_3 como solvente.....	86

Tab. 22- Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de CRFH-3 (CDCl_3 , 75 MHz) com os dados descritos na literatura para a mistura do β -sitosterol e estigmasterol (CDCl_3 , 100 MHz) (Kojima <i>et al</i> , 1990).....	92
Tab. 23- Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de CRFE-2 (δ , piridina- d_5 , 125 MHz) com os dados descritos na literatura para a mistura do β -sitosterol e do estimasterol glicosilado (δ , piridina- d_5 , 100 MHz).....	97
Tab. 24- Padrão de hidrogenação determinado através de análise comparativa entre nos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRTE-1.....	101
Tab. 25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (piridina- d_5) de CRTE-1 e comparação dados de RMN ^{13}C da literatura (Greca, <i>et al.</i> , 1990) para cleomiscosina A e B.....	106
Tab. 26- Extração dos óleos essenciais A e B das folhas de <i>C. regelianus</i>	120
Tab. 27- Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico do óleo essencial B das folhas de <i>C. regelianus</i>	121
Tab. 28- Dados referentes à obtenção dos extratos das folhas, talos e raízes de <i>C. regelianus</i>	122
Tab. 29- Dados referentes ao fracionamento preliminar do extrato hexânico das folhas (CRFH)	124
Tab. 30- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CH_2Cl_2	124
Tab. 31- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D2.....	125
Tab. 32- Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração 45-72	126
Tab. 33- Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D3.....	127
Tab. 34- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt (CRFH-A).....	128
Tab. 35- Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRFH-A3.....	129
Tab. 36- Dados referentes ao fracionamento do extrato etanólico das folhas (CRFE)....	131
Tab. 37- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFE-D	132
Tab. 38- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 45-48.....	133
Tab. 39- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 61-70	133
Tab. 40- Dados referentes ao fracionamento preliminar do extrato hexânico dos talos (CRTH).....	135
Tab. 41- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt (CRTH-A).....	136
Tab. 42- Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRTH-A2.....	137

Tab. 43- Dados referentes ao fracionamento do extrato etanólico dos talos (CRTE).....	140
Tab. 44- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFE-D.....	141
Tab. 45- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 3-4.....	141
Tab. 46- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 32-73.....	142
Tab. 47- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração 36-47.....	142
Tab. 48- Dados resultantes das atividades larvicida e nematostática dos óleos essenciais de <i>C. regelianus</i> e ascaridol	149
Tab. 49- Linhagens de células utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	145
Tab. 50- Atividade citotóxica IC ₅₀ do óleo essencial das folhas de <i>C. regelianus</i> e seu componente majoritário, ascaridol, em linhagens de células tumorais humanas.	152
Tab. 51- Efeito do óleo essencial das folhas de <i>C. regelianus</i> e seu componente majoritário, ascaridol, em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.....	153
Tab. 52- Atividade citotóxica dos extratos de <i>C. regelianus</i>	156
Tab. 53- Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>C. regelianus</i>	156
Tab. 54- Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de <i>C. regelianus</i>	156
Tab. 55- Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração CRTH-A oriunda da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos de <i>C. regelianus</i>	157

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1- Método de extração dos óleos essenciais estudados	121
Fluxograma 2- Rota esquemática da obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas, dos talos e das raízes de <i>C. regelianus</i>	123
Fluxograma 3- Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRFH-1, CRFH-2, CRFH-3, e CRFH-4, obtidos a partir do extrato hexânico das folhas de <i>C. regelianus</i>	130
Fluxograma 4- Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRFE-1 e CRFE-2, obtidos a partir do extrato etanólico das folhas de <i>C. regelianus</i>	134
Fluxograma 5- Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRTH-3 e CRTH-4, obtidos a partir do extrato hexânico dos talos de <i>C. regelianus</i>	139
Fluxograma 6- Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRTE-1 e CRTE-2, obtidos a partir do extrato etanólico dos talos de <i>C. regelianus</i>	143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de CRFH-4	46
Quadro 2- Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de CRTH-4.....	59
Quadro 3- Rota biogenética para biossíntese de CRTH-4 a partir de um diterpeno de esqueleto pimarano.	59
Quadro 4- Fragmentos observados no espectro EM/EM-IES do íon $[M+Na]^+$, que justificam a presença do epóxido e duas hidroxilas na estrutura de CRTE-2.....	70
Quadro 5- Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massa de CRTH-3	85
Quadro 6- Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massa de CRTE-1.....	102
Quadro 7- Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massa de CRFH-1	113
Quadro 8- Estruturas dos constituintes químicos isolados de <i>C. regelianus</i>	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação ótica específica
d^{25}	Densidade
η^{25}	Índices de refração
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG/DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
EM-IES	Espectrometria de Massa com ionização por electrospray
EM	Espectrometria de Massa
IV	Infravermelho
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
APT	Attached Proton Test
BB	Broad Band decoupling
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Rf	Fator de retenção
TR	Tempo de retenção
ppm	Partes por milhão
p.f.	Ponto de fusão
p/v	Percentagem peso / volume
IK	Índice de Kovats
Hz	Hertz
CL ₅₀	Concentração Letal
EC ₅₀	Concentração Efetiva

RESUMO

Este trabalho descreve a investigação fitoquímica de *Croton regelianus* (Euphorbiaceae), visando o isolamento e caracterização estrutural de novos constituintes químicos com potencial farmacológico, bem como a investigação da composição química dos óleos essenciais e avaliação de seu potencial biológico. O estudo dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus* resultou na identificação de 20 constituintes, correspondendo a mais de 98% da composição de cada óleo, ambos constituídos exclusivamente por monoterpenos. O óleo essencial e o ascaridol, componente majoritário, mostraram significativa atividade frente às larvas do *Aedes aegypti* e *Artemia* sp, e moderada atividade nematostática contra ao fitonematóide *Meloidogyne incognita*. Ambos, óleo essencial e ascaridol, também exibiram potente atividade anticancer. A investigação química realizada com os extratos hexânico e etanólico das folhas e talos da referida espécie resultou no isolamento e caracterização de dez substâncias. Do extrato hexânico das folhas foram isolados o triacontanol, fitol, β -sitosterol, (3R, 4R, 6S)-3,6-dihidroxi-1-menteno, enquanto do extrato etanólico foi isolado o glicosídeo do β -sitosterol. Do extrato hexânico dos talos isolou-se uma mistura dos esteróides 6 β -hidroxi-campest-4-en-3-ona e 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, além de (4aS,8aS,-)4,4a,8a,9,10,10a-hexahidro-8a-hidroxi-1,1,4a,7-tetrametilfenantreno-2,6(1H,3H,-)diona. Do extrato etanólico obteve-se o sesquiterpeno 1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno e a cumarina cleomiscosina A. A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM e EM-IES) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) e comparação com dados descritos na literatura, enquanto a composição química dos óleos essenciais estudados foi determinada por CG-EM e CG-DIC. O potencial citotóxico das substâncias isoladas foi avaliado frente às linhagens de células tumorais humanas: cólon (HCT8), mama (MDA-MB-435), leucemia (HL60) e cérebro (SF295), porém não apresentaram atividade citotóxica.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical investigation of *Croton regelianus* (Euphorbiaceae), with the purpose to isolate and characterize new bioactive secondary metabolites, as well as, to investigate the chemical composition of the leaf essential oils and to evaluate its biological potential. The study of the leaf essential oils from samples collected at two different geographical sites resulted in the identification of 20 components. More than 98% of the chemical composition, exclusively monoterpenes, of each oil was determined. The essential oil and its major component, ascaridole, showed potent activity against the *Aedes aegypti* and *Artemia* sp larvae and moderate activity against the nematode *Meloidogyne incognita*. Both, the essential oil and ascaridole also exhibited potent anticancer activity. The phytochemical investigation of hexane and ethanol extracts from leaves and branch of *C. regelianus* conducted to the isolation and characterization of ten substances. From the hexane extract of the leaves were isolated triacontanol, phytol, β -sitosterol and (3*R*, 4*R*, 6*S*)-3,6-dihydroxy-1-menthene, while from ethanol extract were isolated the β -sitosterol glycoside. From the hexane extract of branch were isolated the steroidal mixture 6 β -hydroxy-campest-4-en-3-one and 6 β -hydroxy-estigmast-4-en-3-one, and the (4*aS*,8*aS*,)-4,4*a*,8*a*,9,10,10*a*-hexahydro-8*a*-hydroxy-1,1,4*a*,7-tetramethylphenanthrene-2,6(1*H*,3*H*,)-dione. From the ethanol extract was obtained the sesquiterpene 1 α -hydroxymethyl-6 β -hydroxy-4 α -methyl-7 β -(1-methylethyl)-4 β ,11 β -epoxy-decahydroazulene and the coumarin cleomiscosine A. The structure of all compounds were elucidated by spectroscopic methods, such as IR, LREIMS, HRESIMS, ^1H and ^{13}C NMR, and by comparison with published data for closely related compounds. Even though the cytotoxic properties of all compounds have been tested no one showed any activity.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas. Esta tradição tornou-se um recurso alternativo de grande aceitação tanto nas pequenas comunidades rurais como nos centros urbanos e vem chamando atenção da comunidade científica para comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (Fennel *et al.*, 2004).

As plantas destacam-se também por serem fontes naturais elaboradoras de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas para desempenhar funções vitais, tais como defesa contra predadores e microrganismos. Essas substâncias podem ser importantes para os seres humanos, uma vez que ao apresentarem atividades farmacológicas, podem ter aplicação terapêutica, atuando como medicamento, ou como protótipos para síntese de novos fármacos (Palmeira, 2005).

O gênero *Croton*, um dos maiores da família Euphorbiaceae, é representado por espécies que há muito tempo desempenham papel importante na medicina tradicional em diferentes partes do mundo. Tais usos incluem tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, malária, úlceras e obesidade (Salatino *et al.*, 2007). Corroborando com os usos tradicionais extratos, óleos essenciais e substâncias puras obtidas a partir de espécies de *Croton*, tem demonstrado largo espectro de propriedades biológicas (Bezerra *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2004; Baccelli *et al.* 2005; Eisenreich *et al.*, 2003), de forma que este gênero constitui uma fonte promissora de compostos bioativos que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos.

As informações do uso terapêutico de plantas do gênero *Croton* no tratamento de diversas doenças, inclusive no tratamento de tumores malignos, aliado ao grande número de compostos bioativos obtidos de plantas deste gênero, nos instigou a estudar *Croton regelianus*, popularmente conhecido como velame de cheiro. Segundo Moraes *et al.* (1997) o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. regelianus* mostrou atividade antitumoral frente a camundongos transplantados com tumor Walker.

O presente trabalho descreve o estudo da composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*, coletado em duas localidades distintas, bem como o isolamento e caracterização estrutural dos metabólitos secundários dos extratos hexânico e etanólico das folhas e talos da referida espécie. Além da avaliação dos efeitos larvicida

frente às larvas do *A. aegypti* e de *Artemia* sp, nematicida frente ao fitonematoide *M. incognita* e antitumoral dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*, bem como a investigação das propriedades citotóxicas dos extratos, frações e compostos puros, frente às linhagens de células tumorais humanas de cólon (HCT8), mama (MDA-MB-435), leucemia (HL60) e cérebro (SF295).

A prospecção química do óleo essencial e dos extratos de *C. regelianus*, utilizando técnicas cromatográficas como: cromatografia gravitacional, cromatografia sob média pressão (cromatografia Flash) e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, resultou no isolamento de onze substâncias, uma a partir do óleo essencial e dez a partir dos extratos. A substância isolada do óleo essencial das folhas foi caracterizada como sendo o monoterpene oxigenado, ascaridol (**128**). Do extrato hexânico das folhas foram isolados um álcool graxo de cadeia carbônica normal, conhecido por triacontanol (**140**); um diterpene de esqueleto linear, fitol (**130**); o esteróide β -sitosterol (**137**) e o monoterpene (3*R*, 4*R*, 6*S*)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**131**), enquanto do extrato etanólico foi isolado o glicosídeo do β -sitosterol (**138**). Do extrato hexânico dos talos isolou-se a mistura dos esteróides 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (**135**) e 6 β -hidroxi-campest-4-en-3-ona (**136**) e um norditerpene (4*aS*,8*aS*,-)4,4*a*,8*a*,9,10,10*a*-hexahidro-8*a*-hidroxi-1,1,4*a*,7-tetrametilfenantreno-2,6(1*H*,3*H*,-)diona. Do extrato etanólico dos talos obteve-se um sesquiterpene, 1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno e a cumarina, cleomiscosina A.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM e EM-IES) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais como COSY, HMQC, HMBC e NOESY, enquanto a composição química dos óleos essenciais estudados foi determinada por CG-EM e CG-DIC.

Este trabalho é constituído de sete capítulos disposto da seguinte forma: Capítulo **01** - Considerações botânicas; Capítulo **02** – Levantamento bibliográfico sobre o gênero *Croton* no Brasil; Capítulo **03** - Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de *C. regelianus*; Capítulo **04** – Parte experimental; Capítulo **05** - Estudo do potencial biológico dos óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas de *C. regelianus*; Capítulo **06** – Conclusões; Capítulo **07** – Constantes físicas e dados

espectrométricos. Todas as referências bibliográficas utilizadas estão dispostas no final deste trabalho e foram citadas conforme as normas da ABNT.

OBJETIVOS

1 - Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento quimiotaxonômico e biológico do gênero *Croton*, através do estudo químico e da avaliação do potencial antitumoral, larvicida e nematicida dos óleos essenciais e extratos de *C. regelianus*, uma planta rica em glândula oleíferas, anual, de porte arbustivo, freqüente na flora cearense.

2 - Específicos

- Avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial antitumoral, bem como as atividades larvicida e nematicida dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*;
- Avaliar *in vitro* o potencial citotóxico dos extratos, frações e substâncias puras, frente a várias linhagens de células tumorais humanas;
- Isolar e elucidar as estruturas dos constituintes químicos presentes nos extratos/frações considerados promissores nos ensaios biológicos efetuados;

Capítulo 1

Considerações Botânicas

1 – CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

1.1 – Considerações sobre a família *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae*, pertencente à ordem *Euphorbiales*, é dividida em quatro subfamílias: *Phyllanthoideae*, *Crotonoideae*, *Poranteroideae* e *Ricinocarpoideae*. É uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África (Joly, 1998). No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies representadas por todos os tipos de vegetação (Palmeira, 2005). Dentre os gêneros nativos do Brasil destacam-se, seja pelo número de espécies, seja pela sua utilidade: *Croton* (sague-de-dragão, capixingui e marmeleiro), *Phyllanthus*, *Euphorbia* e *Jatropha*. As plantas destes gêneros são conhecidas no Nordeste com pinhão, e muitas destacam-se por serem espécies ornamentais (Joly, 1998).

Os gêneros mais representativos são *Euphorbia*, *Croton* e *Phyllanthus* com aproximadamente 2.300, 1.300 e 800 espécies, respectivamente. Muitas destas espécies destacam-se pelo potencial econômico ou pelo seu uso na medicina popular. Destacando-se *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) bastante utilizado na medicina popular como diurético e na eliminação de cálculos renais (Joly, 1998; Salatino *et al.*, 2007; Silva & Sales, 2007).

A química das plantas da família *Euphorbiaceae* está entre as mais diversas e interessantes. Inúmeros compostos pertencentes a diferentes classes químicas têm sido relatados. Os diterpenos, alcalóides, flavonóides e triterpenóides são as principais classes, contudo, cumarinas, glicosídeos cianogênicos e taninos também são relatados (Palmeira, 2005).

Segundo Joly (1998) as plantas que compõem esta família possuem “Hábitos bastante variados, existindo como ervas, subarbustos, árvores e também como trepadeiras, com folhas alternas inteiras ou partidas, em geral com estipulas, latentes ou não. Flores sempre de sexo separado, em geral monoclamídeas, ocorrendo também diclamídeas em plantas monóicas, reunidas em inflorescências muito variadas, em geral do tipo cacho. Frutos seco esquizocarpo, separando-se elasticamente em 3 cocos. Estes abrindo-se posteriormente. Sementes ricas em endospermas, muitas vezes oleaginosa, providas de grande carúncula”.

1.2 – Considerações sobre o gênero *Croton*

O gênero *croton* é o segundo mais numeroso da família Euphorbiaceae, compreendendo cerca de 1.300 espécies de ampla distribuição em regiões quentes, menos freqüente em regiões temperadas e raramente em regiões frias (Salatino *et al.*, 2007). Cerca de 300 espécies de *Croton* ocorrem no Brasil, muitas das quais são utilizadas na medicina popular, para os mais variados fins. Dentre as propriedades farmacológicas experimentalmente comprovadas, destaca-se: antiinflamatória, antiulcerogênica, antidiabética e inibidores da enzima acetilcolinesterase (Palmeira, *et al.*, 2006).

A química do gênero *Croton* tem sido bastante explorada e os estudos fitoquímicos efetuados têm conduzido ao isolamento de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e uma grande variedade estrutural de diterpenóides, além de lignanas, benzenóides e outros. Muitas das espécies de *Croton* são produtoras de óleos essenciais, cuja composição química é rica em mono- e sesquiterpenóides, além de fenilpropanóides (Palmeira *et al.*, 2006).

De acordo com Craveiro (1981) as espécies do gênero *Croton* apresentam geralmente, “Folhas com revestimento piloso, inteiras, ou raramente, trilobadas, com estípulas muitas vezes características, principalmente nos ramos jovens e renovos. Apresentam revestimento piloso, algumas vezes com pêlos estrelados, outras, com pêlos lepdotos ou escamosos. As flores de ambos os sexos são pequenas, esbranquiçadas e dispostas em racemos mais ou menos alongados, dispendo-se as masculinas, geralmente mais numerosas, na parte apical e as femininas na parte basal. O fruto é uma cápsula triococa, de 2 a 6 mm de diâmetro e as sementes são geralmente escuras e oleaginosas. Muitas espécies são odoríferas, estando o óleo essencial distribuído em todos os órgãos da planta, principalmente nas folhas e nas cascas do caule”.

1.3 – Considerações sobre *Croton regelianus*

Croton regelianus, pertencente à família Euphorbiaceae, é um subarbusto encontrado no Nordeste brasileiro, popularmente conhecido como velame de cheiro. Possui na base das folhas glândulas turbinadas ou em forma de disco. O cálice feminino é intimamente preso ao ovário e os lóbulos permanecem quase verticais ou tornam-se pouco separados dos frutos. Apresenta pedicelo muito curto, medindo não mais que 1 mm de comprimento (Radcliffe-Smith, 1993)



Foto: Prof. Edilberto R. Silveira

Figura 1 – Fotografia de *C. regelianus*, com detalhes das folhas e inflorescências

Capítulo 2

Revisão bibliográfica sobre o gênero Croton no Brasil

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O GÊNERO *CROTON* NO BRASIL

Neste levantamento bibliográfico são apresentadas as espécies do gênero *Croton* do Brasil estudadas quimicamente, bem como as atividades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais, extratos, frações e compostos puros. Os dados fornecidos foram coletados de artigos publicados até janeiro de 2008, através de pesquisas realizadas no *Scifinder* e nos sites científicos [http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) e [http:// www.webofscience.com](http://www.webofscience.com).

2.1- O gênero *Croton* no Brasil: constituintes químicos e atividades biológicas

O gênero *Croton* é representado por aproximadamente 1.300 espécies, distribuídas preferencialmente nas regiões tropicais e semi-tropicais do planeta (Salatino *et al.*, 2007). Destas, cerca de 300 (23%) espécies ocorrem no Brasil (Palmeira *et al.*, 2006), muitas das quais destacam-se pelo potencial biológico.

Das 300 espécies de *Croton* catalogadas no Brasil, apenas 20 (6,67 %) foram estudadas quimicamente. Entre estas 11 apresentam estudos relativos a atividades biológicas, conforme mostrado na Tabela 1 (pág. 9). Como pode ser visto, grande parte das atividades foram investigadas a partir de óleos essenciais, extratos ou frações principalmente constituídas de alcalóides e compostos fenólicos. A prospecção biológica usando substâncias puras é bastante incipiente. Entre as substâncias testadas destaca-se o diterpeno clerodano *trans*-desidrocrotonina (DCTN), isolado de *C. cajucara*. Este metabólito secundário exibiu uma grande diversidade de atividades, incluindo hipoglicêmica, hipolipidêmica, antígeno-tópica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória e antinociceptiva, antiestrogênica e cardiovascular (Costa *et al.*, 2007). Propriedades antiinflamatórias e antioxidantes também foram observadas em ensaios com flavonóides (Nardi *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos, até a presente data, efetuados com exemplares de espécies de *Croton* de ocorrência brasileira, resultaram no isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais, representados principalmente por diterpenos (35,6 %), alcalóides (24,8 %), flavonóides (12,8 %) e triterpenos (11,0 %). A Tabela 2 (pág. 11) apresenta um panorama da ocorrência das principais classes de compostos por espécie. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, destacam-se *C. cajucara*, *C. soderianus*, *C. argyrophylloides*, *C. betulastes* e *C. Urucurana*.

Tabela 1 - Atividades biológicas reportadas para plantas do gênero *Croton*, no Brasil

Espécie	Substrato	Atividade	Referência	
<i>C. argyrophyloides</i>	óleo essencial	antioxidante	Morais <i>et al.</i> , 2006	
		Larvicida	Morais <i>et al.</i> , 2006	
<i>C. cajucara</i>	ácido argirofílico	Bactericida	Albuquerque <i>et al.</i> , 1974	
	DCTN	Citotóxico	Anazetti <i>et al.</i> , 2004; Freire <i>et al.</i> , 2003	
		antimutagênica	Poersch <i>et al.</i> , 2007	
		cardiovascular	Silva <i>et al.</i> , 2005	
		gastroprotetora	Melo <i>et al.</i> , 2003	
		antiulcerogênica	Rodríguez <i>et al.</i> , 2004; Hiruma-Lima <i>et al.</i> , 2002 e 1999; Brito <i>et al.</i> , 1998	
		hipertrigliceridemia / hipercolesterolemia	Silva <i>et al.</i> , 2001	
		antitumoral	Grynberg <i>et al.</i> , 1999; Melo <i>et al.</i> , 2004	
		antigenotóxica	Agner <i>et al.</i> , 2001; 1999	
		antiestrogênica	Costa <i>et al.</i> , 1999; Maciel <i>et al.</i> , 2000	
		hipoglicêmica	Farias <i>et al.</i> , 1997; Maciel <i>et al.</i> , 2000	
		hipolipidêmica	Costa <i>et al.</i> , 2007	
		antiinflamatória / antinociceptiva	Carvalho <i>et al.</i> , 1996; Maciel <i>et al.</i> , 2000	
		<i>trans</i> -crotinina	antiulcerogênica	Hiruma-Lima <i>et al.</i> , 2002
			antitumoral	Grynberg <i>et al.</i> , 1999
			Citotóxica	Maciel <i>et al.</i> , 2007
			antidiabética	Maciel <i>et al.</i> , 2000
cajucarinolido	Citotóxica	Maciel <i>et al.</i> , 2007		
	isocajucarinolido	Citotóxica	Maciel <i>et al.</i> , 2007	
óleo essencial	antileishmania	Rosa <i>et al.</i> , 2003		
	antiulcerogênica	Hiruma-Lima <i>et al.</i> , 2002; 1999		
	gastroprotetora	Paula <i>et al.</i> , 2006; Lima <i>et al.</i> , 2000		
	antimicrobiana	Alvino <i>et al.</i> , 2005		
	óleo fixo	antifúngica	Souza <i>et al.</i> , 2006	
	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico	antinociceptiva	Campos <i>et al.</i> , 2002	
<i>C. campestris</i>	extrato das folhas	antioxidante	Tieppo <i>et al.</i> , 2006	
	alcalóides ^a	relaxante muscular	Prata <i>et al.</i> , 1993	
<i>C. celtidifolius</i>	extrato etanólico,	antiinflamatório/	Nardi <i>et al.</i> , 2003; 2007	
	flavonóides e	antioxidante		

Revisão bibliográfica sobre o gênero Croton no Brasil – Capítulo 2

	proantocianidinas ^a		
	extrato etanólico	antinociceptiva	Nardi <i>et al.</i> , 2006
	proantocianidinas*	“	Dalbo <i>et al.</i> , 2005; 2006
<i>C. jacobinensis</i>	-	antimicrobiana	Lima <i>et al.</i> , 1973
<i>C. lechleri</i>	graxa vermelha	antioxidante / mutagênica	Lopes <i>et al.</i> , 2004
<i>C. nardus</i>	óleo essencial	antifúngica	Lemos <i>et al.</i> , 1992
<i>C. nepetaefolius</i>	óleo essencial	antioxidante	Morais <i>et al.</i> , 2006
		cardiovascular	Lahlou <i>et al.</i> , 1999
		Larvicida	Morais <i>et al.</i> , 2006
		antinociceptiva	Abdon <i>et al.</i> , 2002
		antiespasmódica / miorrelaxante intestinal	Magalhães <i>et al.</i> , 1998
		vasodilatadora	Lahlou, <i>et al.</i> , 2000
		antiespasmódica	Magalhães <i>et al.</i> , 2004
		miorrelaxante	Magalhães <i>et al.</i> , 2003
<i>C. regelianus</i>	extrato etanólico	antitumoral	Moraes <i>et al.</i> , 1997
<i>C. sellowi</i>	sellocine B	bactericida	d’Albuquerque <i>et al.</i> , 1968
<i>C. soderianus</i>	óleo essencial	Larvicida	Morais <i>et al.</i> , 2006
		antinociceptiva	Santos <i>et al.</i> , 2005
<i>C. urucurana</i>	Extrato aquoso	hemorrágica	Esmeraldino <i>et al.</i> , 2005
	látex ^b	antifúngica	Gurgel <i>et al.</i> , 2005
	Látex ^b	antidiarréica	Gurgel <i>et al.</i> , 2001
	Látex ^b	antinociceptiva	Vietla <i>et al.</i> , 2007
	extrato metanólico/ ácido aleurítico	antimicrobiana	Peres <i>et al.</i> , 1997
	extrato metanólico	analgésica	Peres <i>et al.</i> , 1998
<i>C. zehntneri</i>	óleo essencial	antelmíntica	Camurca-Vasconcelos <i>et al.</i> , 2007
		antiespasmódica	Coelho-de-Souza <i>et al.</i> , 1997
		modulatória	Coelho-de-Souza <i>et al.</i> , 1998
		antioxidante	Morais, <i>et al.</i> , 2006
		Larvicida	Morais <i>et al.</i> , 2006; Santos <i>et al.</i> , 2007
		antinociceptiva	Oliveira <i>et al.</i> , 2001
		cardiovascular	Siqueira <i>et al.</i> , 2006
		Ansiolítica	Lazarine <i>et al.</i> , 2000; Cosentino <i>et al.</i> , 2004
	metil-eugenol	Ansiolítica	Norte <i>et al.</i> , 2005
<i>C. sp^c</i>	óleo essencial/	moluscicida	Becerra <i>et al.</i> , 1986

geijereno

^aFração rica na classe de composto indicada; ^bLátex (popularmente conhecido por sangue de dragão) extraído da casca de *C. urucurana*; ^cTrabalho publicado sem a identificação da espécie

Tabela 2 – Ocorrência de alcalóides, flavonóides e terpenóides por espécie de *Croton*

espécies	alcalóides	flavonóides	diterpenos	triterpenos
<i>C. argyrophylloides</i>	-	-	6	-
<i>C. betulastes</i>	-	1	-	8
<i>C. brasiliensis</i>	-	4	2	-
<i>C. cajucara</i>	-	2	7	1
<i>C. campestris</i>	2	4	-	-
<i>C. celtidifolius</i>	3	1	-	-
<i>C. diasii</i>	-	-	1	-
<i>C. hemargyreus</i>	15	-	2	-
<i>C. mortibusis</i>	4	-	2	-
<i>C. muscicapa</i>	3	-	-	-
<i>C. nepetaefolius</i>	-	-	1	-
<i>C. polyundrus</i>	-	-	3	-
<i>C. salutaris</i>	2	-	-	-
<i>C. sellowi</i>	-	5	-	3
<i>C. sonderianus</i>	-	-	17	-
<i>C. urucurana</i>	-	2	1	1

Terpenóides

Os diterpenos foram os compostos encontrados em maior frequência em espécies do gênero *Croton* estudadas no Brasil. Vale ressaltar que estes dados foram condizentes com os descritos na literatura para espécies estudadas em todo o mundo (Salatino *et al.*, 2007), indicando que esta classe de compostos possa ser de importância quimiotaxonômica para o gênero. Cerca de 39 diterpenos, representados principalmente por *seco-*, *ent-* e *nor-*clerodanos e, menos comum, *anti-cauranos*, cleistantono, *ent-villanovano* e *seco-atrisano* (Tabela 3, pág. 13), são descritos na literatura. Estes compostos são particularmente de interesse, devido às atividades biológicas ou por poder servirem como protótipos para síntese de novas substâncias bioativas.

Os triterpenos também compõem uma das classes de terpenóides frequentemente reportadas no gênero *Croton*. Foram isolados 13 triterpenos, pertencentes principalmente à classe dos lupanos e oleanos (Tabela 6, pág.19).

Alcalóides

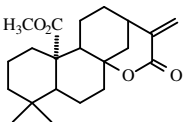
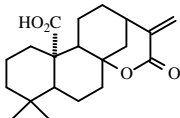
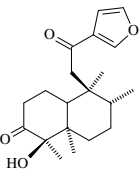
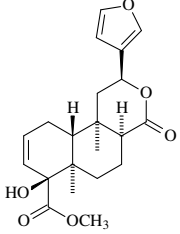
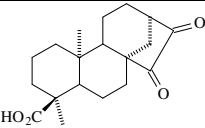
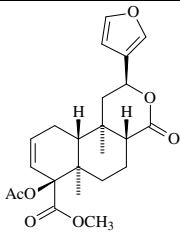
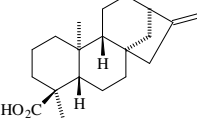
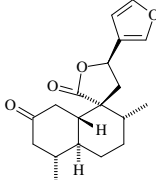
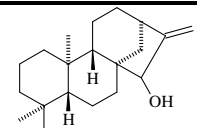
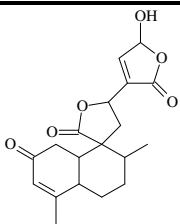
Os alcalóides, juntamente com os diterpenos foram os compostos de maior ocorrência, representados por 27 substâncias, pertencentes a diversos tipos de esqueletos, sendo os isoquinolínicos, indólicos quinolizidínicos e fenetilisoquinolinas os mais abundantes (Tabela 4, pág.16).

Flavonóides

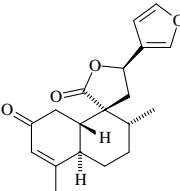
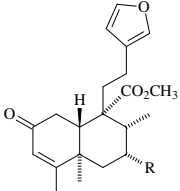
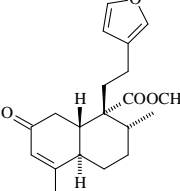
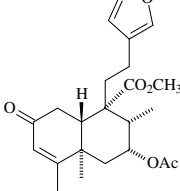
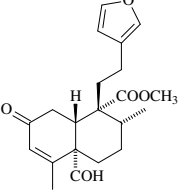
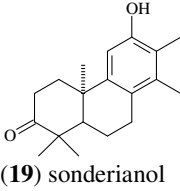
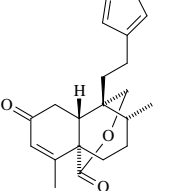
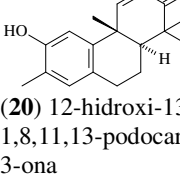
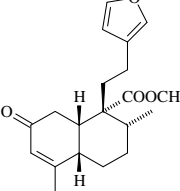
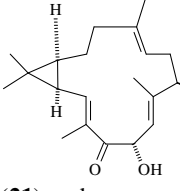
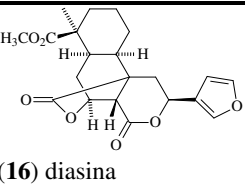
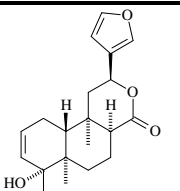
Uma outra classe de metabólitos secundários comum no gênero são os flavonóides, conhecidos por apresentarem diversos tipos de atividades farmacológicas. Do referido gênero foram isolados 14 flavonóides, representados quase que exclusivamente por flavonas, a maioria (83,0 %) contendo uma função oxigenada em C-3 (Tabela 5, pág. 18). Estas substâncias encontram-se na maioria na forma livre, o que é uma característica da família Euphorbiaceae.

Outros metabólitos especiais como esteróides, cumarinas, sesquiterpenóides, açúcares e derivados do ácido benzóico, também foram isolados no gênero e estão sumarizadas nas Tabelas 7 e 8 (pág. 21).

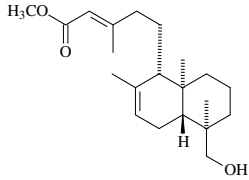
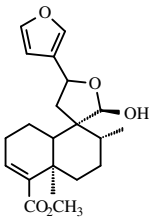
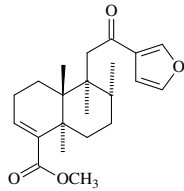
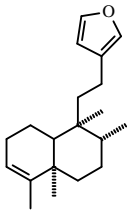
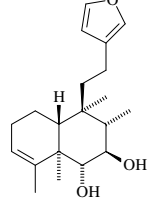
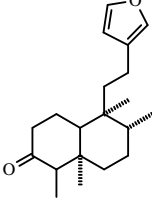
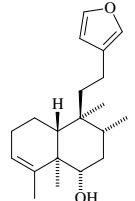
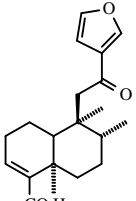
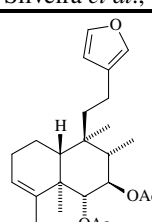
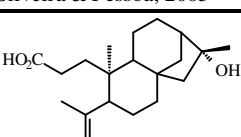
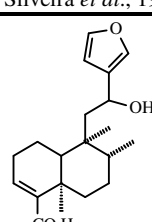
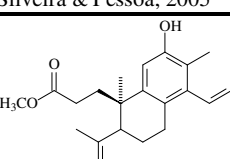
Tabela. 3- Diterpenos isolados a partir de espécies do gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécie	Estrutura	Espécie
 <p>(1) dodecahidro-9,9-dimetil-4-metileno-5-oxo-, metil éster 3,6a-metano-6aH-naft2,1-b]oxocin-12a(7H)-ácido carboxílico</p>	<i>C. argyrophyloides</i>	 <p>(6) 3,6a-metano-6aH-naft2,1-b]oxocin-12a(7H)-ácido carboxílico, dodecahidro-9,9-dimetil-4-metileno-5-oxo</p>	<i>C. argyrophyloides</i>
Monte <i>et al.</i> , 1984		Monte <i>et al.</i> , 1984	
 <p>(2) 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-diene</p>	<i>C. argyrophyloides</i>	 <p>(7) crotobrasilina B</p>	<i>C. brasiliensis</i>
Monte <i>et al.</i> , 1988		Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005	
 <p>(3) ácido caur-16-en-18-ico, 15-oxo(4β)</p>	<i>C. argyrophyloides</i>	 <p>(8) crotobrasilina A</p>	<i>C. brasiliensis</i>
Monte <i>et al.</i> , 1988		Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005	
 <p>(4) ácido argirofílico</p>	<i>C. argyrophyloides</i>	 <p>(9) <i>trans</i>-crotonina</p>	<i>C. cajucara</i>
Monte <i>et al.</i> , 1988		Maciel <i>et al.</i> , 2000; Maciel <i>et al.</i> , 1998	
 <p>(5) caur-16-ene-15,18-diol, (4β)</p>	<i>C. argyrophyloides</i>	 <p>(10) cajucarínolido</p>	<i>C. cajucara</i>
Monte <i>et al.</i> , 1988		Maciel <i>et al.</i> , 2000; Maciel <i>et al.</i> , 1998	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

 <p>(11) trans-desidrocrotina Maciel <i>et al.</i>, 2000 1998; Simões <i>et al.</i>, 1979</p>	<p><i>C. cajucara</i></p>  <p>(17) cromiargino Amaral <i>et al.</i>, 1998</p>
 <p>(12) trans-cajucarina B Maciel <i>et al.</i>, 2000; Maciel <i>et al.</i>, 1998</p>	<p><i>C. cajucara</i></p>  <p>(18) 7-acetoxicromiargino Amaral <i>et al.</i>, 1998</p>
 <p>(13) cajucarina A Maciel <i>et al.</i>, 2000; Maciel <i>et al.</i>, 1998</p>	<p><i>C. cajucara</i></p>  <p>(19) sonderianol ¹Araujo-Junior <i>et al.</i>, 2004; ²Craveiro <i>et al</i> 1982;</p>
 <p>(14) cajucarina Maciel <i>et al.</i>, 2000; Maciel <i>et al.</i>, 1998</p>	<p><i>C. cajucara</i></p>  <p>(20) 12-hidroxi-13-metil-1,8,11,13-podocarpatetraen-3-ona Araujo-Junior <i>et al.</i>, 2004</p>
 <p>(15) cis-cajucarina B Maciel <i>et al.</i>, 2000; Maciel <i>et al.</i>, 1998</p>	<p><i>C. cajucara</i></p>  <p>(21) casbano Moura <i>et al.</i>, 1990</p>
 <p>(16) diasina Alvarenga <i>et al.</i>, 1978</p>	<p><i>C. diasii</i></p>  <p>(22) cordatina Araujo-Junior <i>et al.</i>, 2002</p>
	<p><i>C. hemiargyreus</i></p> <p><i>C. mortibensis</i>¹ <i>C. sonderianus</i>²</p> <p><i>C. moritibensis</i></p> <p><i>C. nepetaefolius</i></p> <p><i>C. polyandrus</i></p>

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

 <p>(23) ácido-18-hidroxi-labda-7,13-dien-15-óico metil ester</p> <p>Araujo-Junior <i>et al.</i>, 2002</p>	<p><i>C. polyandrus</i></p>	 <p>(29) sonderianial</p> <p>McChesney <i>et al.</i>, 1989</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>
 <p>(24) ester do ácido 12-oxo-hardwickico</p> <p>¹Araujo-Junior <i>et al.</i>, 2002; ²Silveira & Pessoa, 2005</p>	<p><i>C. polyandrus</i>¹ <i>C. sonderianus</i>²</p>	 <p>(30) <i>trans</i>-anoneno</p> <p>McChesney <i>et al.</i>, 1990</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>
 <p>(25) 6α,7β-dihydroxianoneno</p> <p>Silveira <i>et al.</i>, 1994</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>	 <p>(31) <i>trans</i>-cascarilona</p> <p>McChesney <i>et al.</i>, 1990</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>
 <p>(26) 6α-hidroxianoneno</p> <p>Silveira <i>et al.</i>, 1994</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>	 <p>(32) ácido 12-oxo-hardwickico</p> <p>Silveira & Pessoa, 2005</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>
 <p>(27) 6α,7β-diacetoxianoneno</p> <p>Silveira <i>et al.</i>, 1994</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>	 <p>(33) ácido 3,4-<i>seco</i>-4(18)16α-hidroxi-cauran-3-óico</p> <p>Silveira & Pessoa, 2005</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>
 <p>(28) 12-hidroxi-hardwickico</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>	 <p>(34) 3,4-<i>seco</i>-sonderianol</p>	<p><i>C. sonderianus</i></p>

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

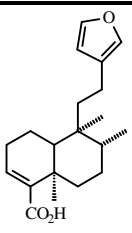
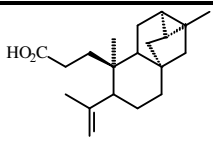
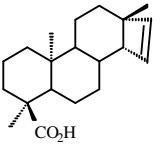
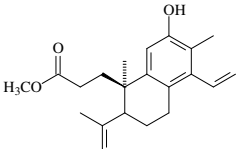
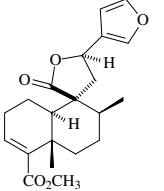
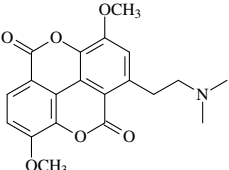
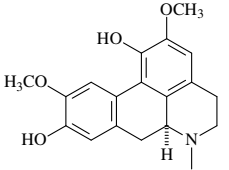
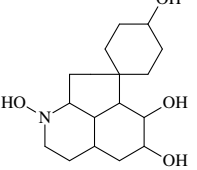
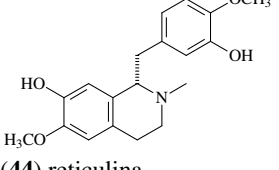
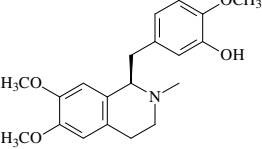
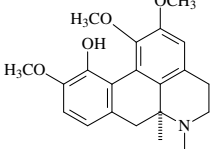
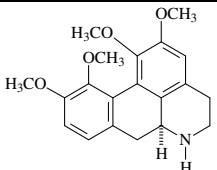
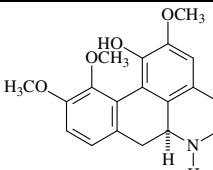
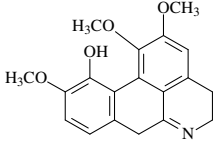
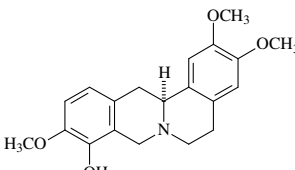
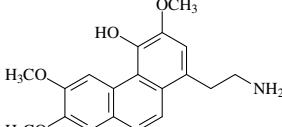
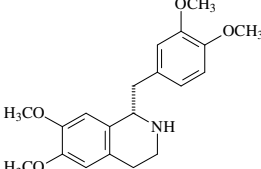
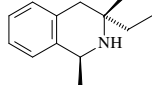
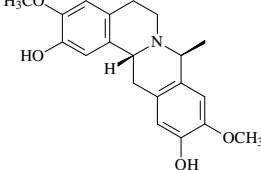
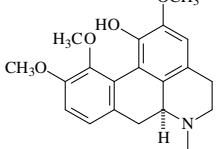
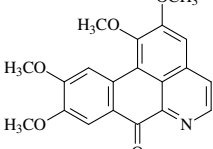
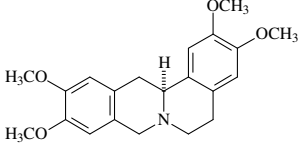
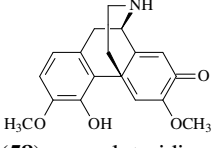
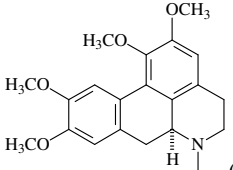
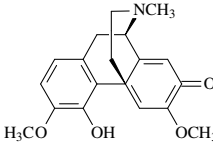
McChesney <i>et al.</i> , 1989	<i>C. sonderianus</i>	Craveiro <i>et al</i> 1982	<i>C. sonderianus</i>
			
(35) ácido hardwickico		(38) ácido 3,4-seco-traquilobanóico	
McChesney <i>et al.</i> , 1991	<i>C. sonderianus</i>	McChesney <i>et al.</i> , 1991	<i>C. sonderianus</i>
			
(36) ácido <i>ent</i> -beier-15-en-18-óico		(39) 3,4-seco-sonderianol	
McChesney <i>et al.</i> , 1991	<i>C. sonderianus</i> ¹ <i>C. urucurana</i> ²	Craveiro <i>et al</i> 1982	
			
(37) sonderianina			
¹ Craveiro <i>et al.</i> , 1981; ² Peres, <i>et al.</i> , 1997			

Tabela 4 - Alcalóides isolados a partir de espécies do gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécie	Estrutura	Espécie
	<i>C. campestris</i>		<i>C. celtidifolius</i>
(40) taspina		(43) isoboldina	
Ribeiro Prata <i>et al.</i> , 1993		Amaral <i>et al.</i> , 1997	
	<i>C. campestris</i>		<i>C. celtidifolius</i>
(41) 2,10-trihidroxicrotosinolina-N-óxido		(44) reticulina	
Ribeiro Prata <i>et al.</i> , 1993		Amaral <i>et al.</i> , 1997	
	<i>C. celtidifolius</i>		<i>C. hemiargyreus</i>
(42) laudanidina		(45) isocoridina	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

Amaral <i>et al.</i> , 1997	<i>C. hemiargyreus</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>
			
(46) hemiargina A		(53) nor-coridina	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>
			
(47) hemiargina B		(54) tetrahidropalmatrubina	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>
			
(48) hemiargina C		(55) nor-laudanosina	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>
			
(49) hemiargina D		(56) hemiargirina	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>	Amaral <i>et al.</i> , 1998	<i>C. hemiargyreus</i>
			
(50) coridina		(57) oxoglauca	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i>	Amaral <i>et al.</i> , 1998	<i>C. hemiargyreus</i> ¹ <i>C. salutaris</i> ²
			
(51) xilopinino		(58) nor-salutaridino	
Lin <i>et al.</i> , 2003	<i>C. hemiargyreus</i> ^{1,2}	¹ Amaral <i>et al.</i> , 1998; ² Barnes <i>et al.</i> , 1981;	<i>C. hemiargyreus</i> ^{1,2} <i>C. salutaris</i> ³
			
(52)		(59) salutaridina	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

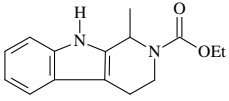
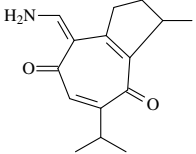
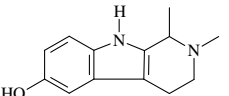
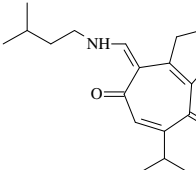
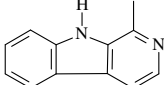
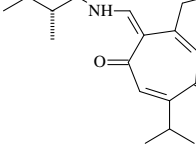
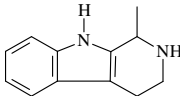
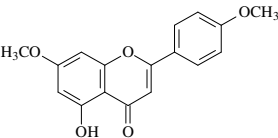
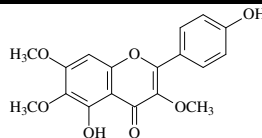
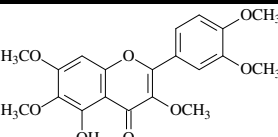
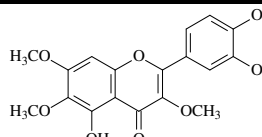
glaucina			
¹ Lin <i>et al.</i> , 2003; ² Amaral <i>et al.</i> , 1998		¹ Lin <i>et al.</i> , 2003; ² Amaral <i>et al.</i> , 1998 ³ Barnes <i>et al.</i> , 1981	
	<i>C. moritibensis</i>		<i>C. muscicapina</i>
(60) 2-etoxicarbonitetraharmano		(64) muscicapina A	
Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2004		Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2005	
	<i>C. moritibensis</i>		<i>C. muscicapina</i>
(61) 6-hidroxi-2-metiltetraharmano		(65) muscicapina B	
Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2004		Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2005	
	<i>C. moritibensis</i>		<i>C. muscicapina</i>
(62) 1-metil- β -carbolina		(66) muscicapina C	
Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2004		Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2005	
	<i>C. moritibensis</i>		
(63) tetraharmano			
Araujo-Junior <i>et al.</i> , 2004			

Tabela 5- Flavonóides isolados a partir de espécies do gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécie	Estrutura	Espécie
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. brasiliensis</i> ¹ <i>C. sellowii</i> ²
(67) 4',7-dimetilapigenina		(70) penduletina	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		¹ Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005; ² Palmeira <i>et al.</i> , 2006	
	<i>C. brasiliensis</i> ¹ <i>C. sellowii</i> ²		<i>C. brasiliensis</i> ¹ <i>C. sellowii</i> ²
(68) artemetina		(71) crisosfenetina	
¹ Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005; ² Palmeira <i>et al.</i> , 2006		¹ Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005; ² Palmeira <i>et al.</i> , 2006	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

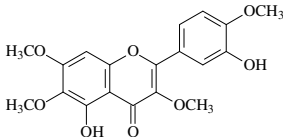
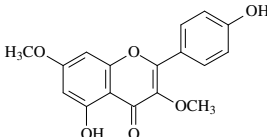
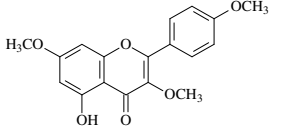
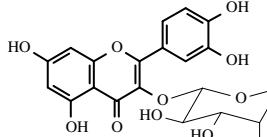
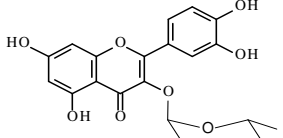
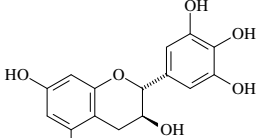
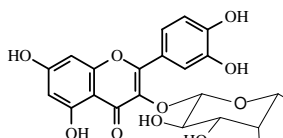
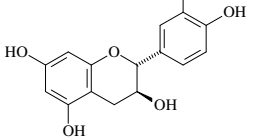
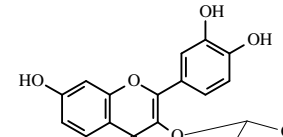
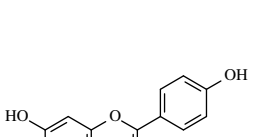
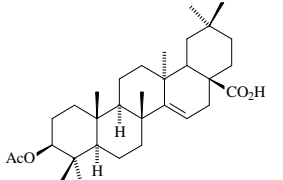
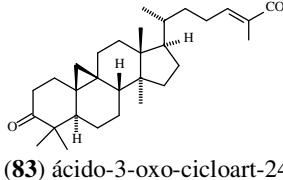
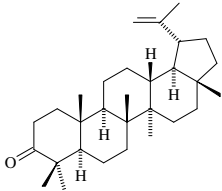
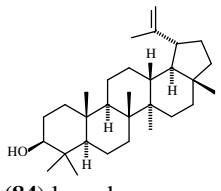
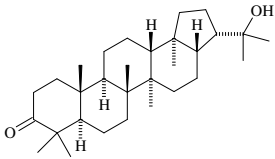
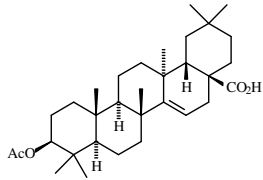
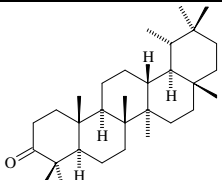
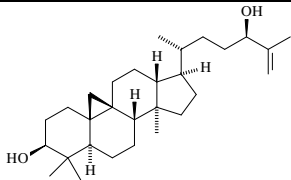
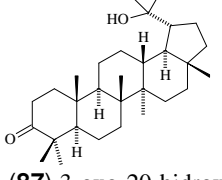
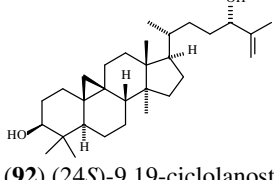
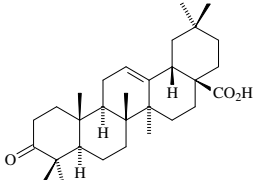
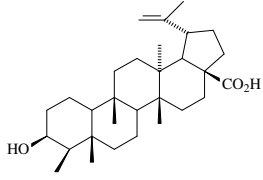
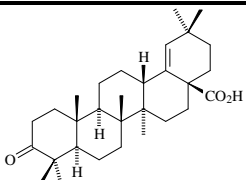
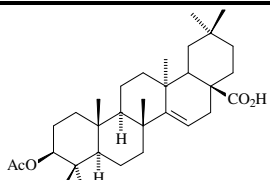
	<i>C. brasiliensis</i> ¹ <i>C. sellowii</i> ²		<i>C. cajucara</i>
(69) casticina ¹ Palmeira-Junior <i>et al.</i> , 2005; ² Palmeira <i>et al.</i> , 2006		(72) jaranol Maciel <i>et al.</i> , 2000	
	<i>C. cajucara</i>		<i>C. campestris</i>
(73) 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona Maciel <i>et al.</i> , 2000		(77) guaijaverina Santos <i>et al.</i> , 2005	
	<i>C. campestris</i>		<i>C. celtidifolius</i> ¹ <i>C. urucurana</i> ²
(74) quercitrina Santos <i>et al.</i> , 2005		(78) galocatequina ¹ Nardi, <i>et al.</i> , 2003; ² Peres, <i>et al.</i> , 1997	
	<i>C. campestris</i>		<i>C. celtidifolius</i> ¹ <i>C. urucurana</i> ²
(75) hiperina Santos <i>et al.</i> , 2005		(79) catequina ¹ Nardi, <i>et al.</i> , 2003; ² Peres, <i>et al.</i> , 1997	
	<i>C. campestris</i>		<i>C. sellowii</i>
(76) 3-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosido quercetina Santos <i>et al.</i> , 2005		(80) tilirosideo Palmeira <i>et al.</i> , 2006	

Tabela 6 - Triterpenos presentes em espécies do gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécies	Estrutura	Espécies
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. betulaster</i>
(81) ácido acetilaurítico Barreto <i>et al.</i> , 2005		(83) ácido-3-oxo-cicloart-24E-en-26-óico Barbosa <i>et al.</i> , 2003	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2

	<i>C. betulaster</i>		<i>C. betulaster</i>
(82) lupenona		(84) lupeol	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		Barbosa <i>et al.</i> , 2003	
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. cajucara</i> ^{1,2} <i>C. urucurana</i> ³
(85) 3-oxo-22-hidroxihipano		(90) acetato do ácido aleuritico	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		¹ Maciel <i>et al.</i> , 2000; ² Maciel <i>et al.</i> , 1998; ³ Peres, <i>et al.</i> , 1998;	
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. sellowii</i>
(86) 3-oxo-20- β -hidroxitaraxastano		(91) (24 <i>R</i>)-cicloart-25-en-3 β ,24-diol	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		Palmeira <i>et al.</i> , 2006	
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. sellowii</i>
(87) 3-oxo-20-hidroxiilupano		(92) (24 <i>S</i>)-9,19-ciclolano-25-ene-3 β ,24-diol	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		Palmeira <i>et al.</i> , 2006	
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. sellowii</i>
(88) ácido-3-oxo-olean-12-en-28-óico		(93) ácido betulínico	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		Palmeira <i>et al.</i> , 2006	
	<i>C. betulaster</i>		<i>C. betulaster</i>
(88) ácido-3-oxo-olean-18-en-28-óico		(94) ácido acetilaleuritorico	
Barbosa <i>et al.</i> , 2003		Barreto <i>et al.</i> , 2005	

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Croton* no Brasil – Capítulo 2**Tabela 7** - Esteróides isolados a partir de espécies gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécies	Estrutura	Espécies
<p>(95) β-sitosterol</p>	<i>C. cajucara</i> ¹ <i>C. celtidifolius</i> ² <i>C. sellowii</i> ³ <i>C. urucurana</i> ⁴	<p>(97) estigmasterol</p>	<i>C. cajucara</i> ¹ <i>C. celtidifolius</i> ² <i>C. sellowii</i> ³ <i>C. urucurana</i> ⁴
¹ Maciel <i>et al.</i> , 2000; ² Mukherjee & Edgardo 1984; ³ Palmeira <i>et al.</i> , 2006; ⁴ Peres, <i>et al.</i> , 1997		¹ Maciel <i>et al.</i> , 2000; ² Mukherjee & Edgardo 1984; ³ Palmeira <i>et al.</i> , 2006; ⁴ Peres, <i>et al.</i> , 1997	
<p>R= O-Glicosídeo</p> <p>(96) β-sitosterol glicosilado</p>	<i>C. cajucara</i> ¹ <i>C. urucurana</i> ²	<p>(98) campesterol</p>	<i>C. urucurana</i>
¹ Maciel <i>et al.</i> , 2000; ² Peres, <i>et al.</i> , 1997		Peres, <i>et al.</i> , 1997	

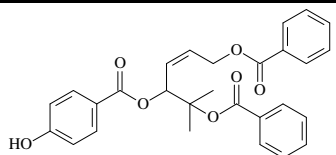
Tabela 8 - Outras substâncias isolados a partir de espécies do gênero *Croton* no Brasil

Estrutura	Espécies	Estrutura	Espécies
<p>(99) 1-deoxi-2-C-metil-, 6-benzoate 3-(4-hidroxibenzoate)</p>	<i>C. betulaster</i>	<p>(103) (+)-bornesitol</p>	<i>C. celtidifolius</i>
Barbosa <i>et al.</i> , 2004		Mukherjee & Edgardo, 1984	
<p>(100) Z-tetracosanoate de butila</p>	<i>C. campestris</i>	<p>(104) D-<i>mio</i>-inositol, 3-O-metil-, pentaacetato</p>	<i>C. celtidifolius</i>
Ribeiro Prata <i>et al.</i> , 1993		Mukherjee & Edgardo, 1984	
<p>(101) <i>neo</i>-inositol</p>	<i>C. celtidifolius</i>	<p>(105) 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxiacetofenona</p>	<i>C. nepetaefolius</i>
Mukherjee & Edgardo, 1984		Moura <i>et al.</i> , 1990	
<p>1,2- (102) dideoxi-5-O-etil-2-metil-,</p>	<i>C. luetzelburgii</i>	<p>(106) sacarose</p>	<i>C. nepetaefolius</i>

Revisão bibliográfica sobre o gênero Croton no Brasil – Capítulo 2

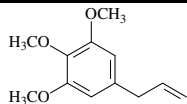
4-benzoate 3-(4-hidroxibenzoato

Barbosa *et al.*, 2004



(107) benzoato, 4-hidroxi-, 4-(benzoióxi)-1-[1-(benzoióxi)-1-metiletil]-2 de butenila

Barbosa *et al.*, 2004

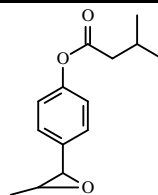


(108) elemicina

Moura *et al.*, 1990

C. luetzelburgii

Moura *et al.*, 1990



(109) sellovicino B

d' Albuquerque *et al.*, 1968

C. sellowi

Capítulo 3

Determinação Estrutural

3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3.1 - Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*

Neste trabalho foi realizado o estudo da composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus* coletadas nas localidades de Viçosa (óleo A) e Garapa (óleo B) no estado do Ceará, visando avaliar possíveis alterações na composição química dos mesmos.

Os óleos foram extraídos pelo processo de hidrodestilação, em aparelho doseador tipo Clevenger (item 4.3.3. pág. 79, Fluxograma 1, pág. 121) e obtidos nos rendimentos (p/v) de 1,05 e 0,49%, respectivamente, os quais apresentaram as seguintes propriedades físicas: óleo A, $[\alpha]_D^{20} + 12^\circ$ ($c = 0,05$; CHCl_3); η^{25} 1,6642; d^{25} 0,9267 g/mL; óleo B $[\alpha]_D^{20} - 8^\circ$ ($c = 0,05$; CHCl_3); η^{25} 1,6558; d^{25} 0,9567 g/mL.

As amostras foram analisadas por cromatografia gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) (Figuras 2 e 4, pág. 26 e 27, respectivamente) e cromatografia gás-líquido acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) (Figuras 3 e 5, pág. 26 e 27, respectivamente) e seus constituintes químicos identificados através dos espectros de massas (Figuras 6 a 25, págs. 28 a 32), índices de Kovats corrigidos e comparação com espectros de massas de substâncias armazenados em banco de dados e da literatura (Adams, 2001). A correção dos índices de Kovats foi efetuada através de regressão linear usando o tempo de retenção e o índice de Kovats de alguns constituintes presentes no óleo, cuja existência parecia aceitável. Os constituintes químicos, incluindo seus respectivos índices de Kovats e suas percentagens estão sumarizados na Tabela 9, pág. 24.

Considerando as duas amostras de óleo analisadas, um total de 20 constituintes foram identificados, representando mais de 98% da composição química da cada óleo, os quais foram constituídos exclusivamente por monoterpenos. Apesar da similaridade na análise qualitativa, foi observada na análise quantitativa uma diferença significativa na composição química dos óleos (Tabela 9, pág 24). *p*-Cimeno (22,3%), ascaridol (17,0%) e cânfora (13,0%), seguidos por limoneno (7,6%), foram os principais constituintes detectados no óleo A, enquanto, ascaridol (33,9%), *p*-cimeno (21,6%), α -terpineno (9,6%), e isoascaridol (7,5%) foram os compostos que predominaram no óleo B.

O espectro de massas do constituinte majoritário do óleo B (33,9%), não apresentou padrão de fragmentação compatível com os descritos na literatura (Adams, 2001). Desta forma, uma alíquota do óleo essencial foi submetida à cromatografia em gel de sílica resultando no isolamento da substância majoritária, cuja estrutura foi elucidada por RMN ^1H e ^{13}C . A análise dos dados espectrais levou a estrutura do ascaridol, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 33.

Tabela 9 – Composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*

Constituintes ^a	IK ^b	A (%) ^c	B (%) ^d	Identificação ^e
Triciclano	928	0,5	-	EM, TR
α -Tujeno	933	1,2	1,0	EM, TR
α -Pino	939	4,1	0,9	EM, TR
Canfeno	951	1,4	-	EM, TR
β -Pino	978	-	0,8	EM, TR
Mirceno	992	3,6	3,8	EM, TR
α -Felandreno	1004	7,1	2,0	EM, TR
α -Terpineno	1016	5,0	9,6	EM, TR
<i>p</i> -Cimeno	1024	22,3	21,6	EM, TR
Limoneno	1029	7,6	0,1	EM, TR
1,8-Cineol	1031	0,7	0,2	EM, TR
γ -Terpineno	1059	6,1	6,8	EM, TR
Terpinoleno	1088	-	0,9	EM, TR
Linalol	1099	2,3	-	EM, TR
Cânfora	1143	13,0	3,1	EM, TR
Isoborneol	1157	1,9	2,7	EM, TR
4-Terpineol	1178	2,2	2,8	EM, TR
α -Terpineol	1191	1,1	0,6	EM, TR
Ascaridol	1239	17,0	33,9	EM, RMN e TR
Isoascaridol	1303	2,9	7,5	EM, TR
Total		100	98,3	

^aConstituintes listados em ordem de eluição em coluna OV-5. ^bIK = Índice kovat. ^cA = percentagem dos constituintes do óleo essencial de *C. regelianus* coletado em Viçosa. ^dB = percentagem dos constituintes do óleo essencial de *C. regelianus* coletado em Garapa. ^eMétodo usado na identificação dos constituintes químicos

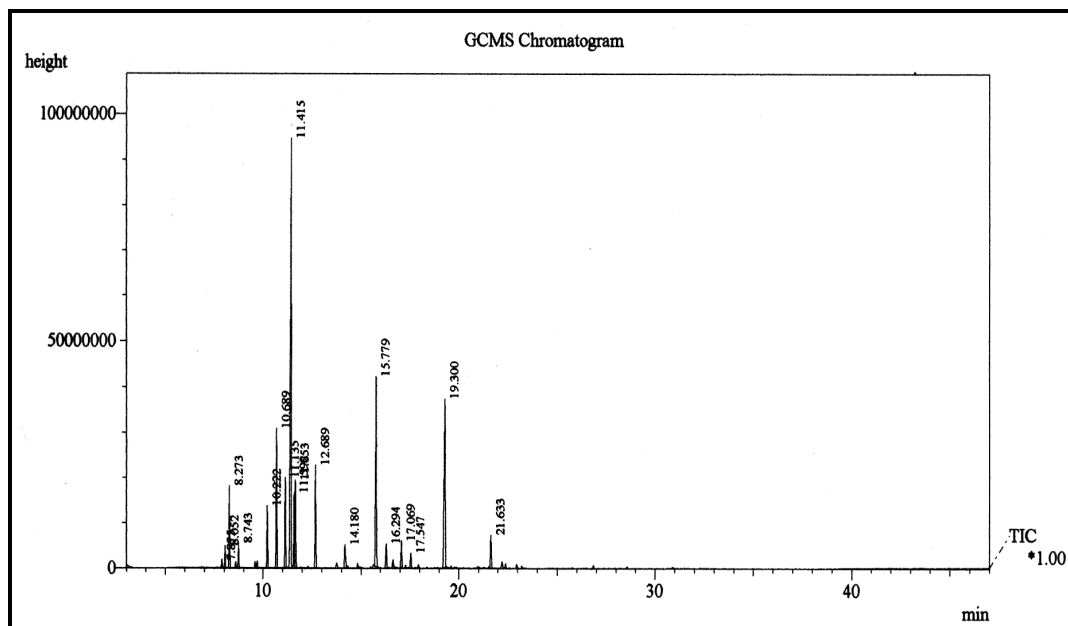


Figura 2 – Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* (óleo A)

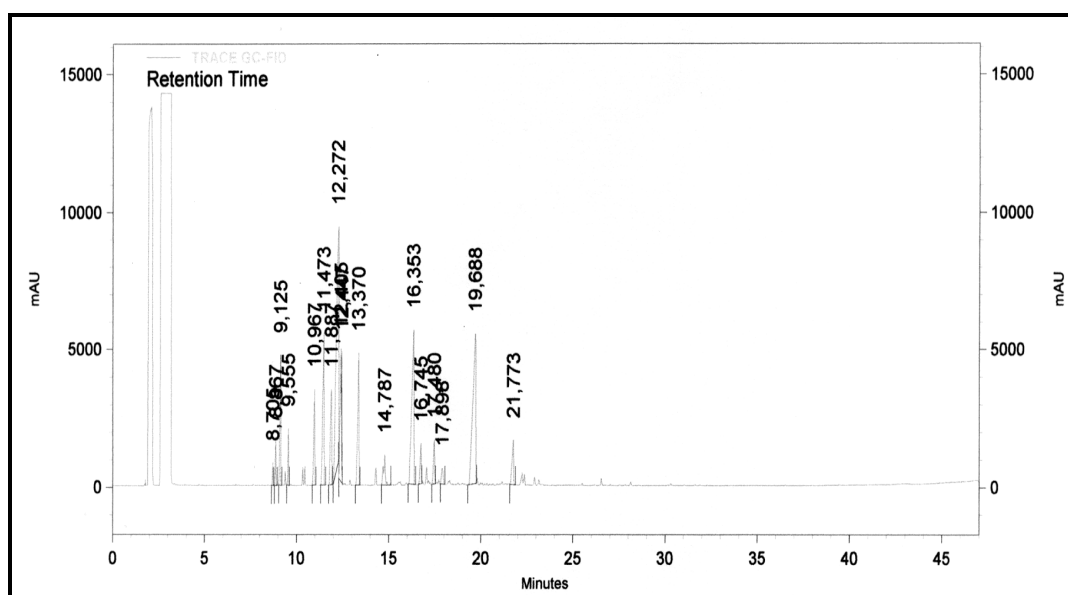


Figura 3 – Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* (óleo A)

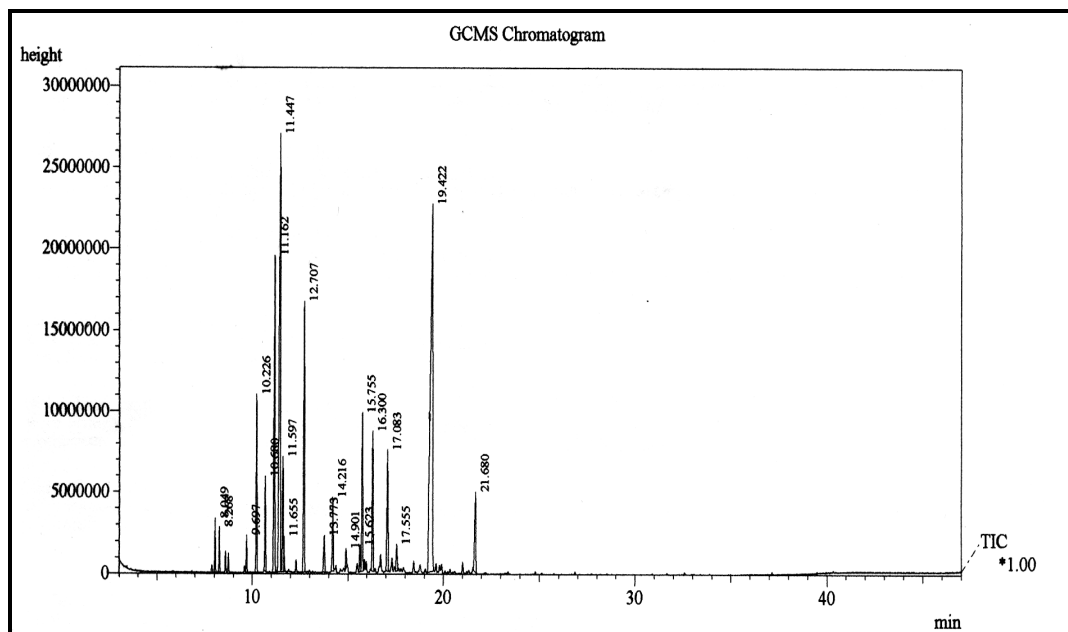


Figura 4 – Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* (óleo B)

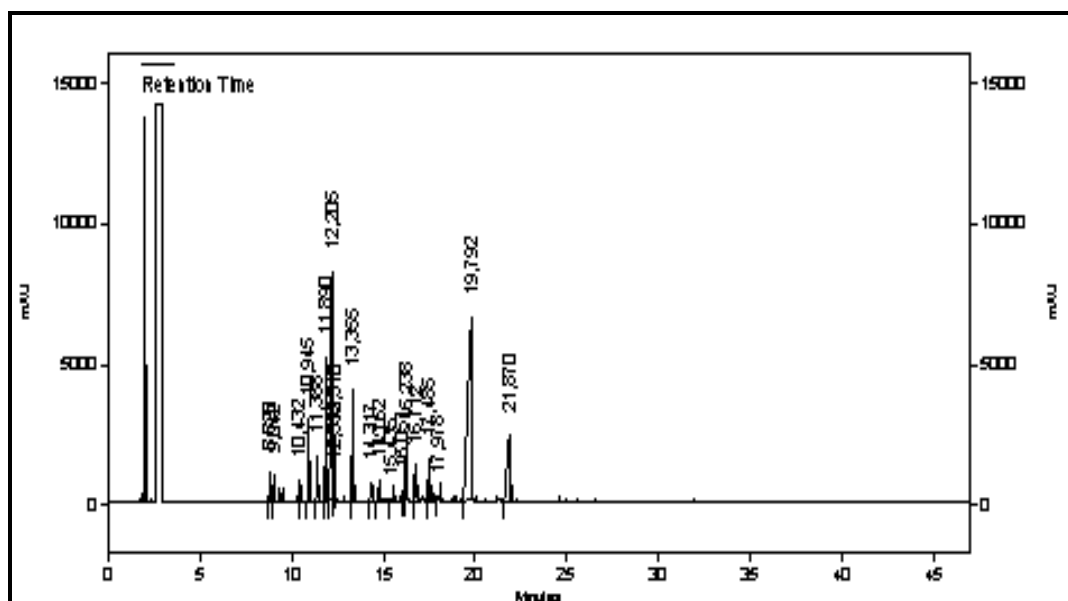


Figura 5 – Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* (óleo B)

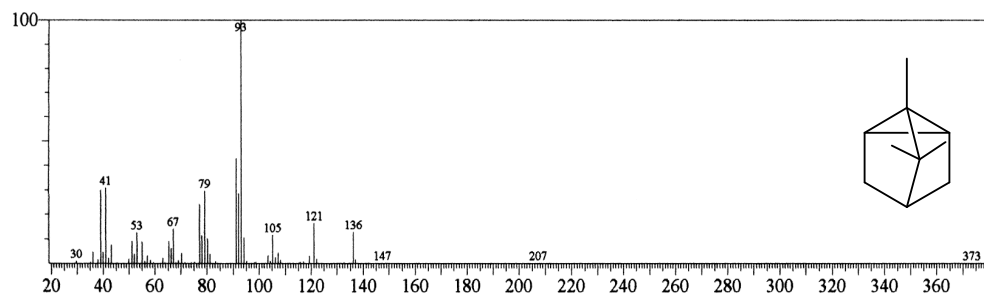


Figura 6 – Espectro de massas do triciclano (110)

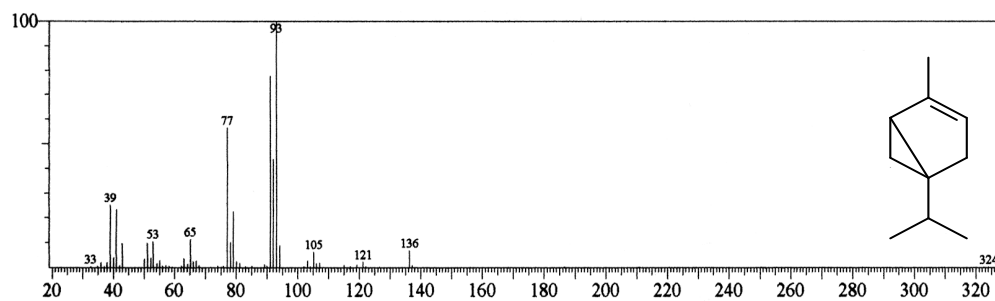


Figura 7 – Espectro de massas do α -tujeno (111)

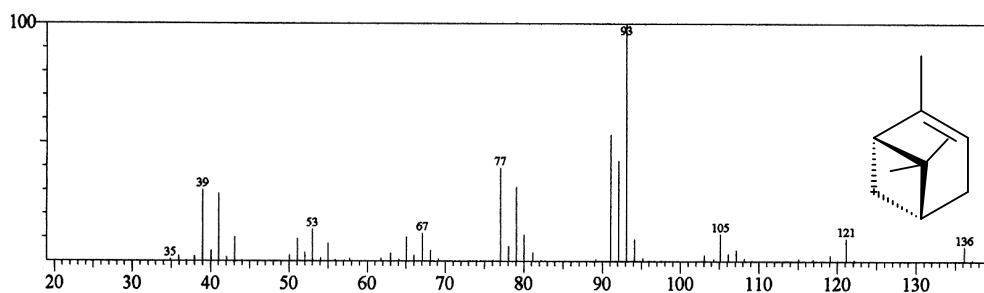


Figura 8 – Espectro de massas do α -pineno (112)

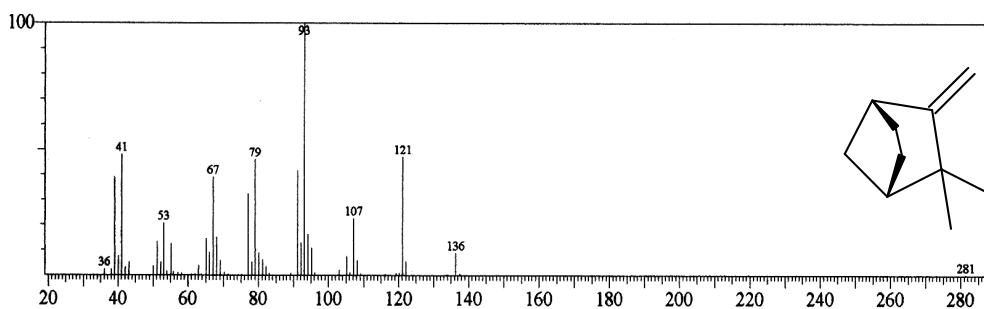


Figura 9 – Espectro de massas do canfeno (113)

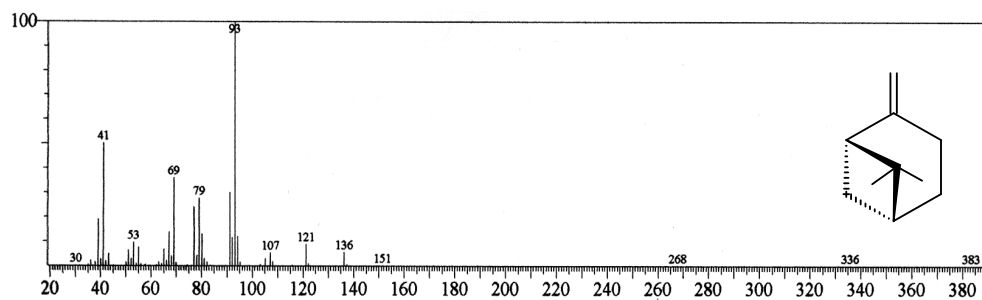


Figura 10 – Espectro de massas do β -pineno (114)

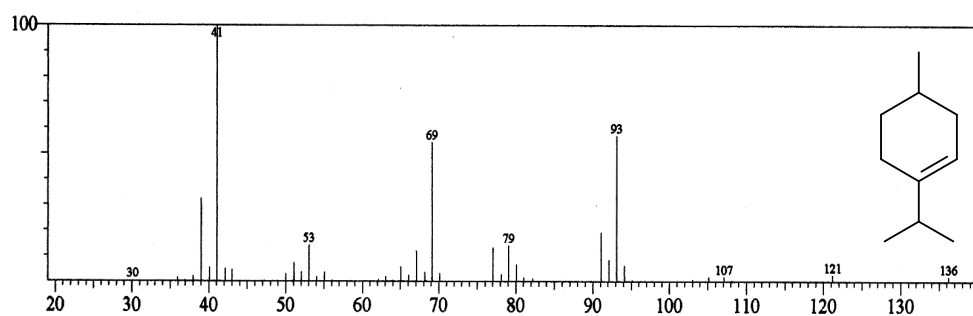


Figura 11 – Espectro de massas do mirceno (115)

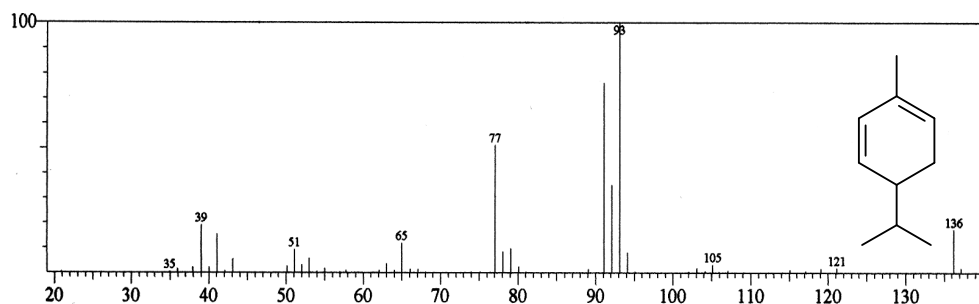


Figura 12 – Espectro de massas do α -felandreno (116)

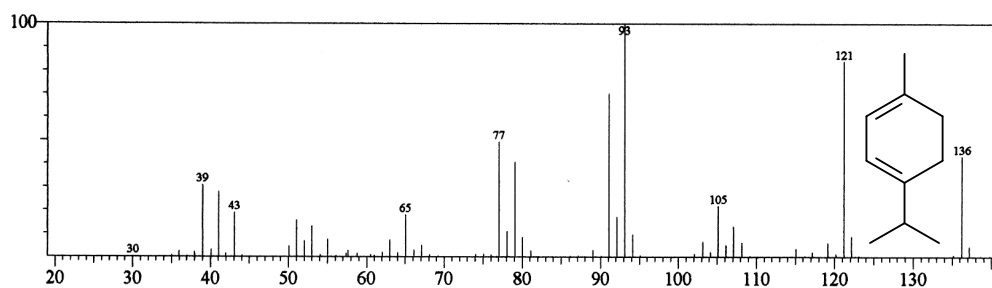


Figura 13 – Espectro de massas do α -terpineno (117)

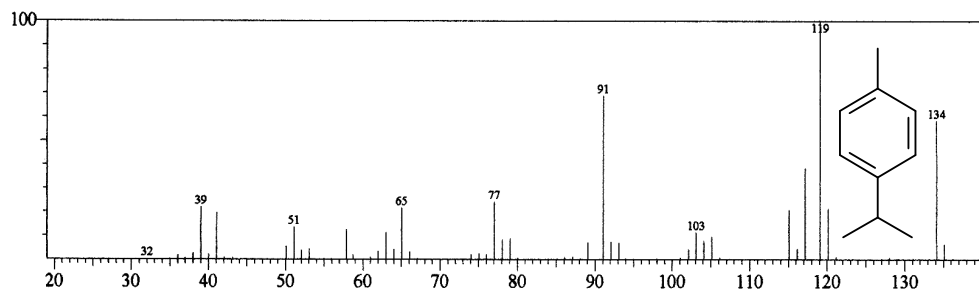


Figura 14 – Espectro de massas do *p*-cimeno (118)

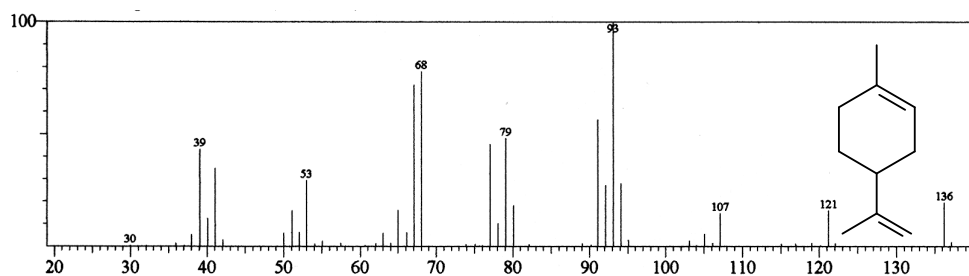


Figura 15 – Espectro de massas do limoneno (119)

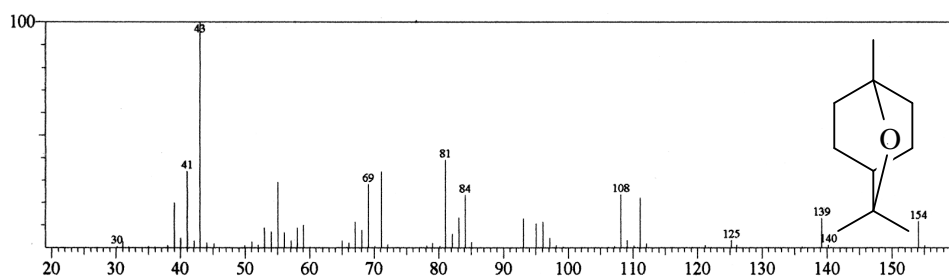


Figura 16 – Espectro de massas do 1,8-cineol (120)

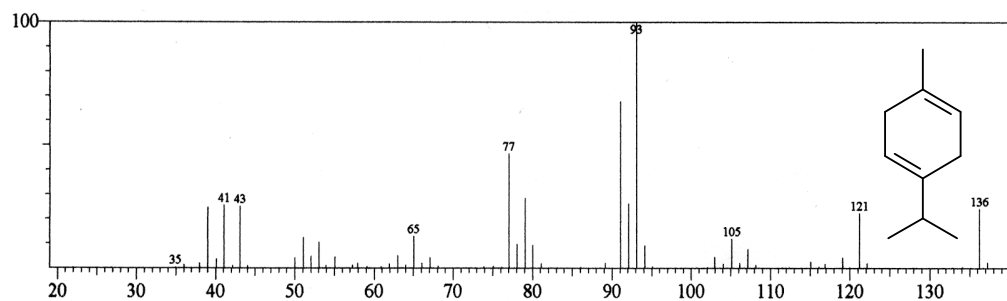


Figura 17 – Espectro de massas do γ -terpineno (121)

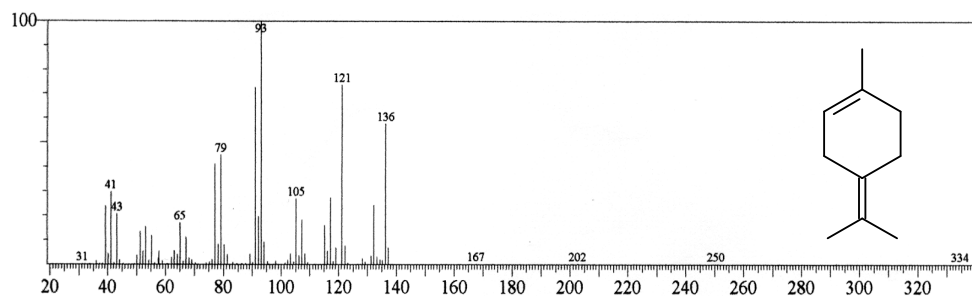


Figura 18 – Espectro de massas do terpinoleno (122)

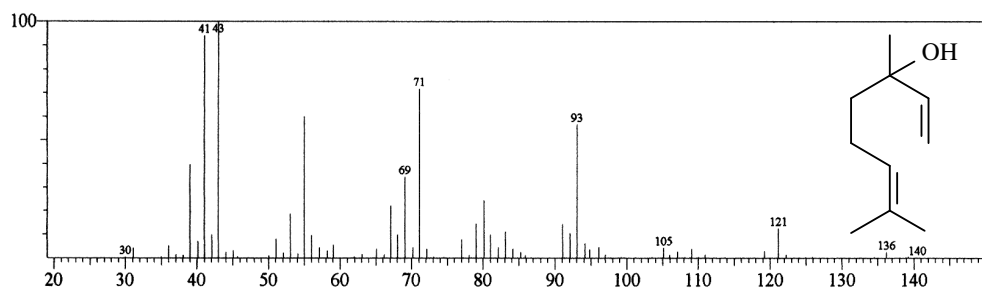


Figura 19 – Espectro de massas do linalool (123)

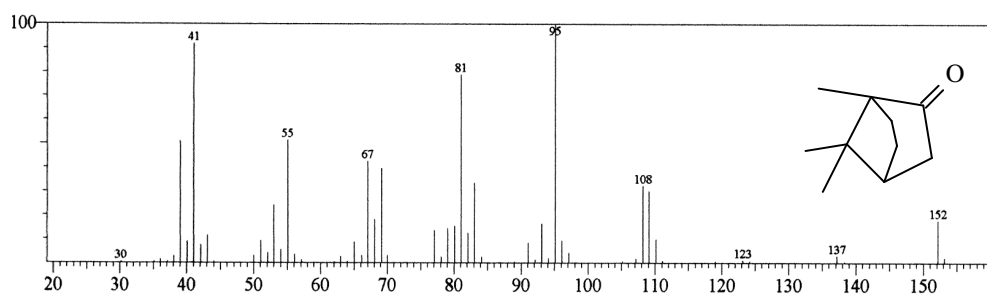


Figura 20 – Espectro de massas da cânfora (124)

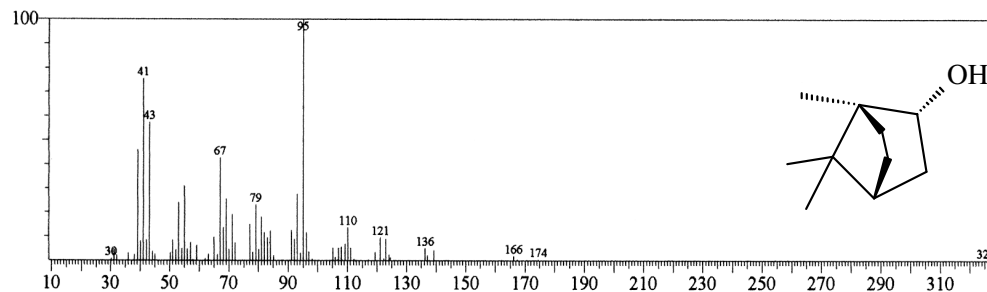


Figura 21 – Espectro de massas do isoborneol (125)

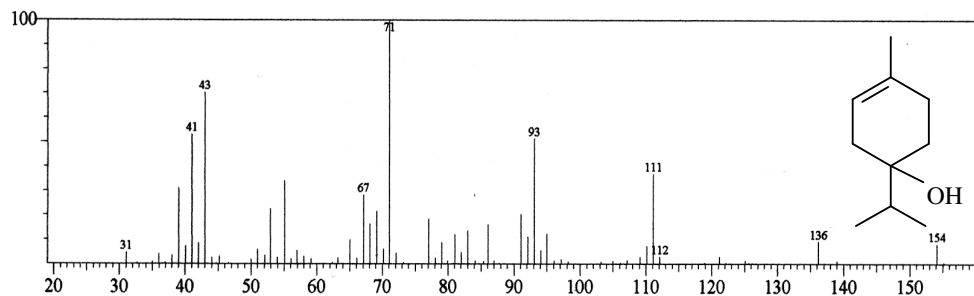


Figura 22 – Espectro de massas do 4-terpineol (126)

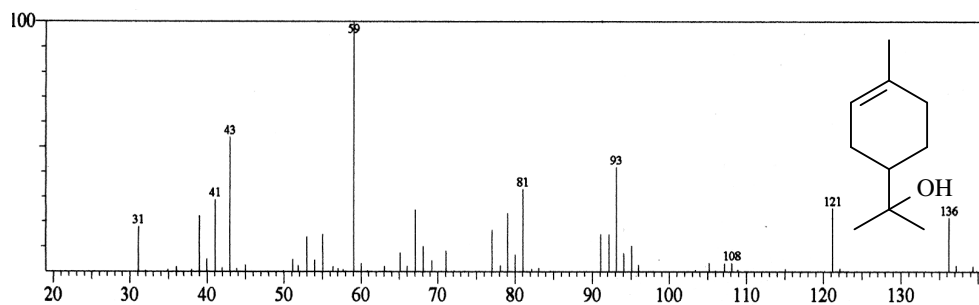


Figura 23 – Espectro de massas do α -terpineol (127)

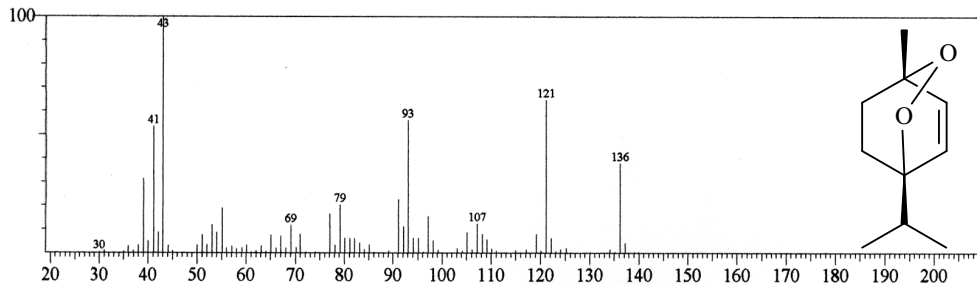


Figura 24 – Espectro de massas do ascaridol (128)

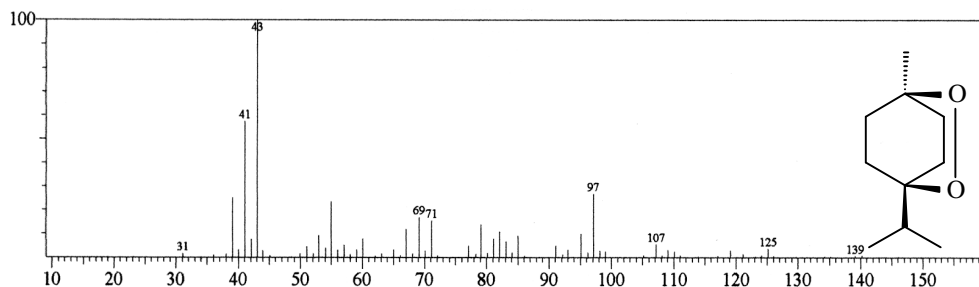


Figura 25 – Espectro de massas do isoascaridol (129)

3.2 – Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de *C. regelianus*

3.2.1 – Determinação estrutural dos terpenos

3.2.1.1 – Determinação estrutural de CRB-1 (128)

Cromatografia em gel de sílica do óleo essencial (óleo B, obtido das folhas de *C. regelianus* de Viçosa) resultou no isolamento de 420 mg de um composto, denominado CRB-1, item 4.3.4 (pág. 121).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 26, pág. 37) apresentou uma banda em 3031 cm^{-1} , características de deformação axial de ligação =C-H, indicando a presença da ligação C=C; bandas entre $2967\text{-}2884\text{ cm}^{-1}$, características de deformação axial de ligação C-H de grupamentos metílicos e metilênicos; além das bandas em 1246 e 1017 cm^{-1} associadas à deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] (Fig. 27, pág. 37) apresentou sinais correspondentes a dez átomos de carbono, revelando a natureza monoterpênicica do composto. A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 28, pág. 38), mostrou a presença de três carbonos metínicos, sendo dois com hibridização sp^2 ; dois carbonos metilênicos, três carbonos metílicos e dois carbonos não-hidrogenados, conforme descrito na Tabela 10 (pág. 34).

Os dados descritos, juntamente com o espectro de massas (Fig. 29, pág. 38) obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, o qual forneceu o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 168 Daltons, possibilitaram inferir para CRB-1 a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$, a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio igual a três. Sendo um atribuído a dupla ligação carbono-carbono, enquanto os outros dois, foram atribuídos a um sistema bicíclico.

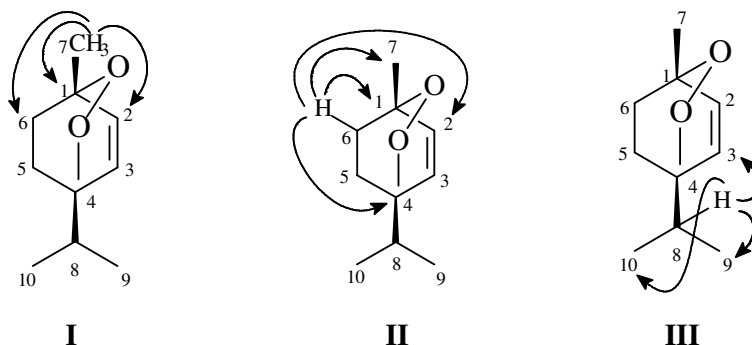
O espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] (Fig. 30, pág. 39) apresentou um dubleto em $\delta_{\text{H}} 1,07$ ($J = 6,9$ Hz) com integração para seis átomos de hidrogênio (3H-9/3H-10), um multiplete em $\delta_{\text{H}} 1,99$ (H-8) e um sigleto em $\delta_{\text{H}} 1,45$ (3H-7), indicando a presença de um grupamento isopropila e um grupo metila na estrutura de CRB-1. Este espectro mostrou ainda sinais correspondentes a hidrogênios de grupos metilênicos em $\delta_{\text{H}} 1,57$ (2H-5) e $2,10$ (2H-6), os quais apresentaram acoplamentos vicinais no espectro COSY (Fig. pág.). Adicionalmente, na região de desproteção, observou-se sinais em $\delta_{\text{H}} 6,48$ (d, $J = 8,5$

Hz) e 6,57 (d, $J = 8,5$ Hz), os quais, pelo valor da constante de acoplamento, são característicos de uma dupla ligação de olefina com configuração *cis*.

Tabela 10 – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRB-1

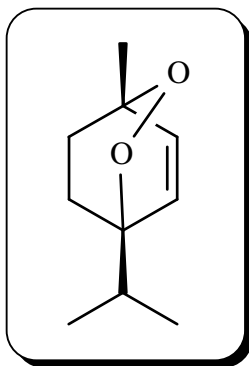
C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
79,9 (C-O)	136,5	29,7	21,5	
74,4 (C-O)	133,2	25,5	17,3	
	32,3		17,2	
2C	3CH	2CH₂	3CH₃	C₁₀H₁₆O₂

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) – HMBC (Fig. 31, pág. 38) foi decisivo na atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos, (Tabela 11, pág. 33). Através deste experimento, observaram-se correlações a longa distância entre os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,45 (3H-7) com os carbonos em δ_{C} 74,4 (C-1, $^2J_{\text{CH}}$), 136,5 (C-2, $^3J_{\text{CH}}$) e 29,7 (C-6, $^3J_{\text{CH}}$) (estrutura **I**); e dos hidrogênios em δ_{H} 2,10 (2H-6) com os carbonos em δ_{C} 74,4 (C-1, $^2J_{\text{CH}}$), 21,5 (C-7, $^3J_{\text{CH}}$), 79,9 (C-4, $^3J_{\text{CH}}$) e 136,5 (C-2, $^3J_{\text{CH}}$) (estrutura **II**), justificando assim o grupo metila no carbono C-1. Observaram-se ainda, correlações do hidrogênio metínico em δ_{H} 1,99 (H-8) com os carbonos em δ_{C} 17,3/17,2 (C-9/C-10, $^2J_{\text{CH}}$), e 133,2 (C-3 $^3J_{\text{CH}}$), confirmando a posição de um grupo isopropila em C-4 (estrutura **III**).



Após análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (Kiuchi *et al.*, 2002) (Tabela 11, pág. 36), foi possível caracterizar CRB-1 como sendo o monoterpene 2,3-dioxabicyclico[2,2,2]oct-5-ene,1-metil-4(1-metiletil), conhecido por ascaridol, relatado na literatura com um potente agente antineoplásico (Efferth *et al.*, 2002).

Conforme nossos resultados, esta substância mostrou propriedades larvicidas, nematicida e anticâncer, esta última, corroborando com a literatura.

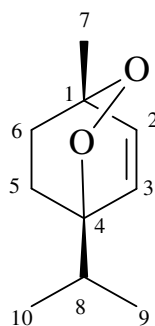


Ascaridol (128)

Tabela 11 – Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de CRB-1 com aqueles registrados na literatura para o ascaridol (300 e 75 MHz, CDCl_3) (Kiuchi *et al.*, 2002).

C	CRB-1		Ascaridol *Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	74,4	-	74,3	-
2	136,5	6,48 (d; 8,5)	136,3	6,37 (d, $J=8,5$)
3	133,2	6,57 (d; 8,5)	133,0	6,46 (d, $J=8,5$)
4	79,9	-	79,7	-
5	25,5	1,57 (d; 9,4)	25,5	1,48 (m)
6	29,7	2,10 (m)	29,4	1,99 (m)
7	21,5	1,45 (s)	21,3	1,34 (s)
8	32,2	1,99 (m)	32,1	1,89 (m)
9	17,3	1,07 (d; 6,9)	17,2	0,98 (s)
10	17,2	1,07 (d; 6,9)	17,1	0,95 (s)

Constante de acoplamento (J) em Hz entre parênteses



CRB-1

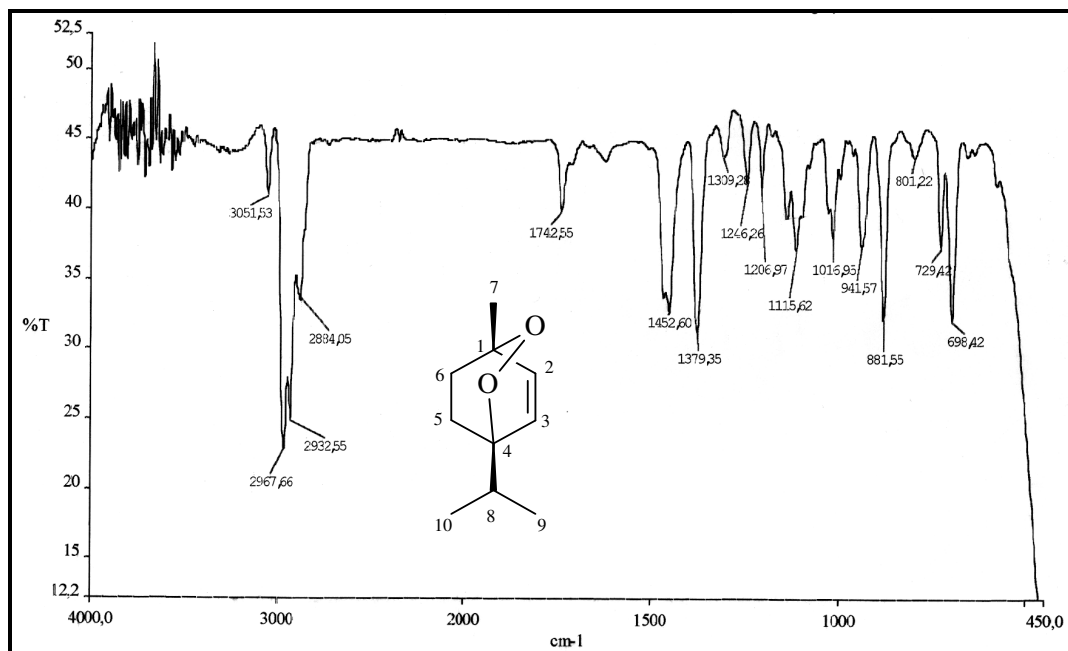


Figura 26 – Espectro de absorção na região do IV (NaCl cm⁻¹) de CRB-1 (128)

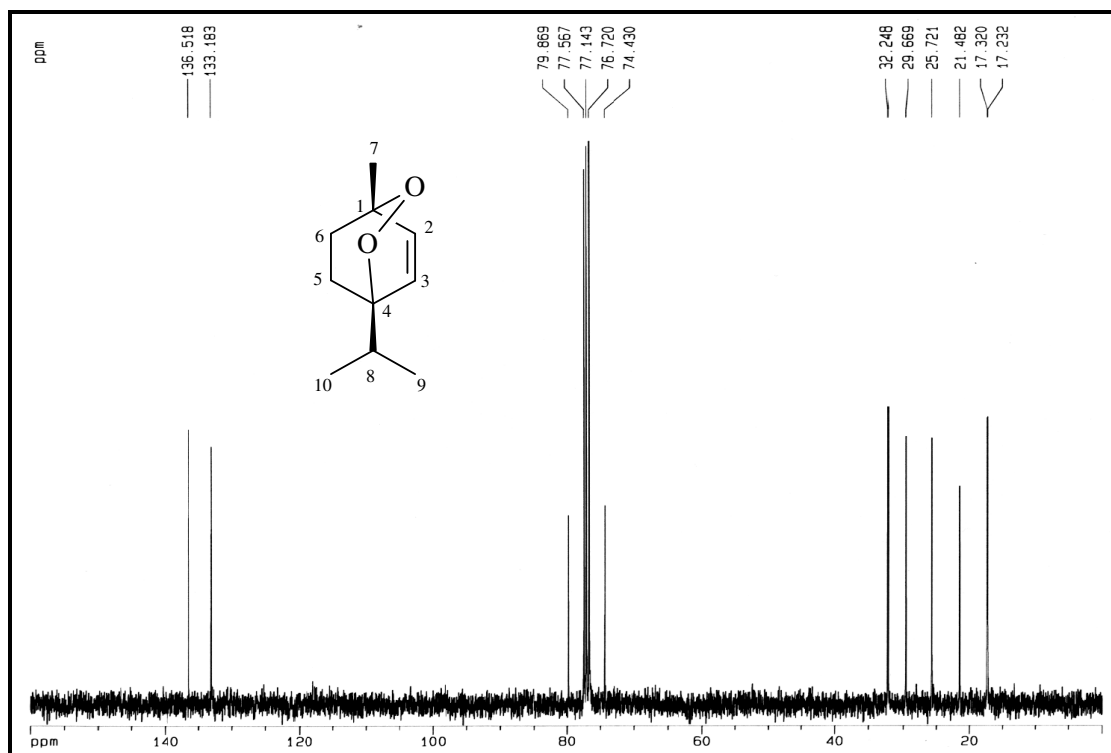


Figura 27 – Espectro de RMN ¹³C-BB [75 MHz, CDCl₃] de CRB-1 (128)

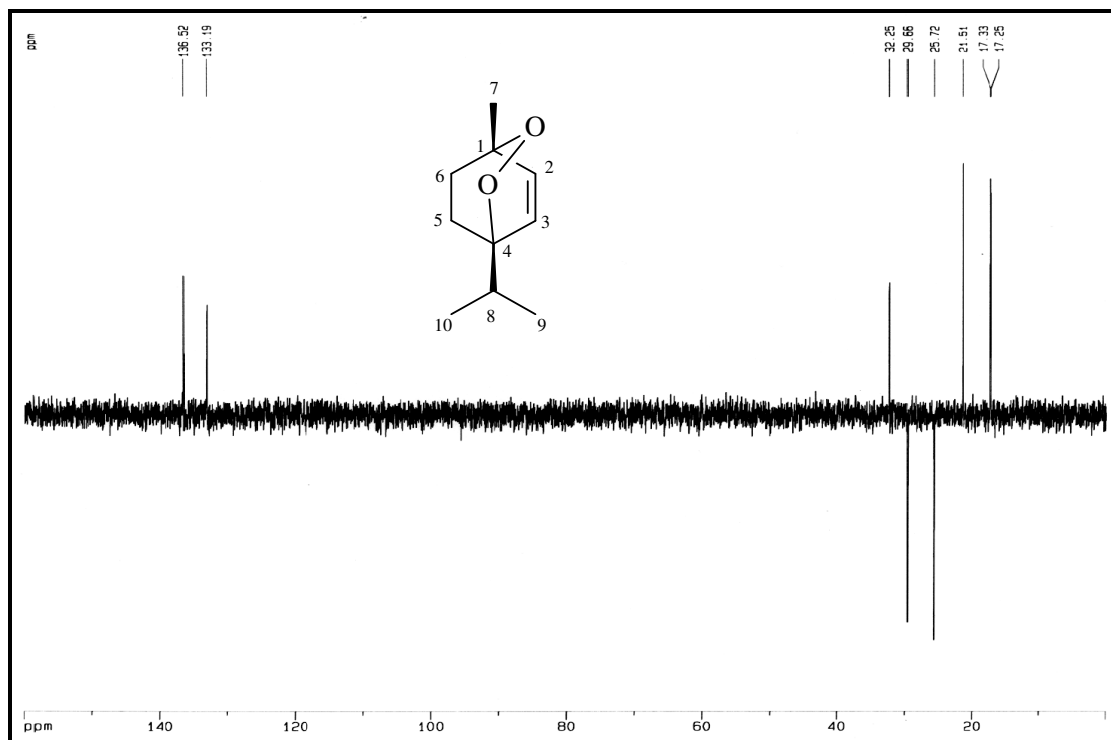


Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [75 MHz, CDCl_3] de CRB-1 (128)

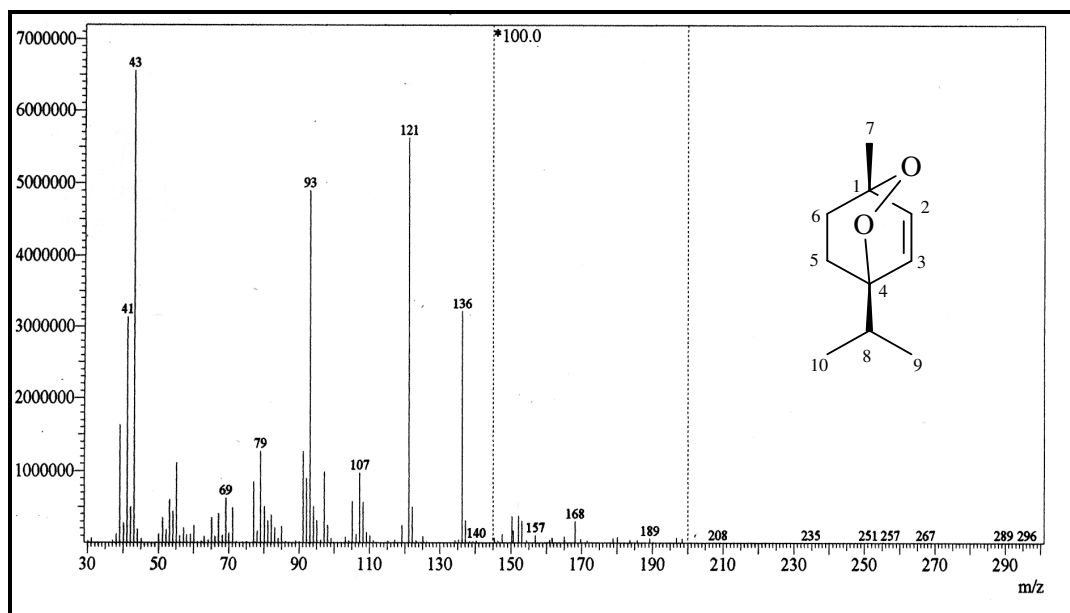


Figura 29 – Espectro de massas de CRB-1 (128)

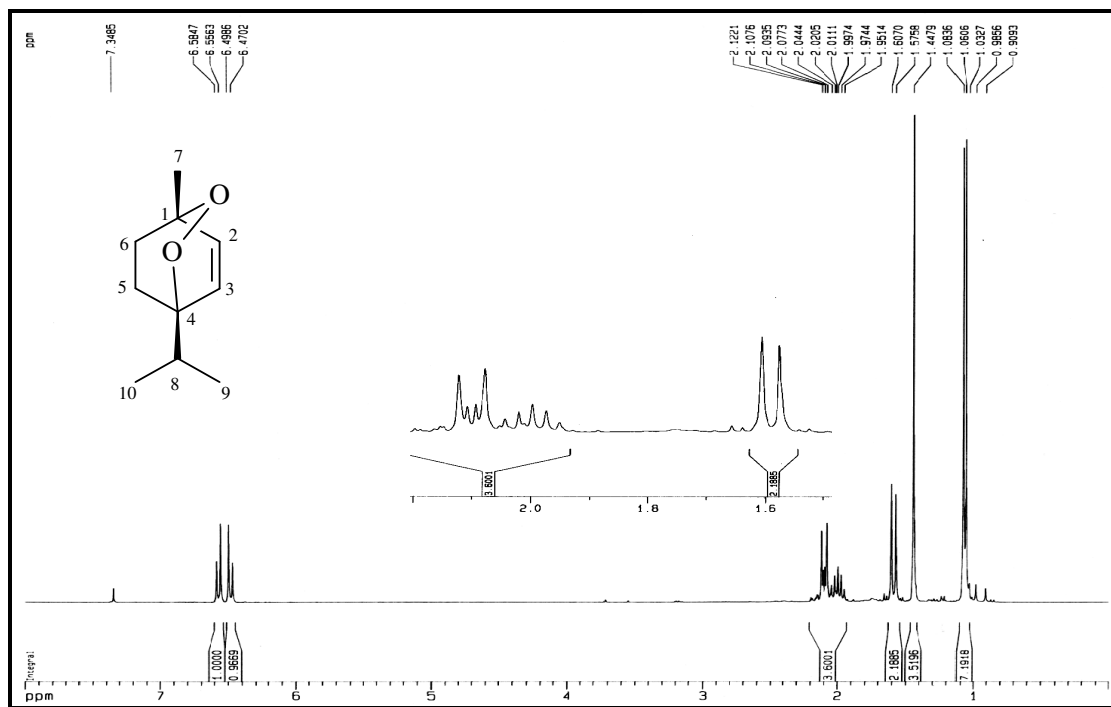


Figura 30 – Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CRB-1 (128)

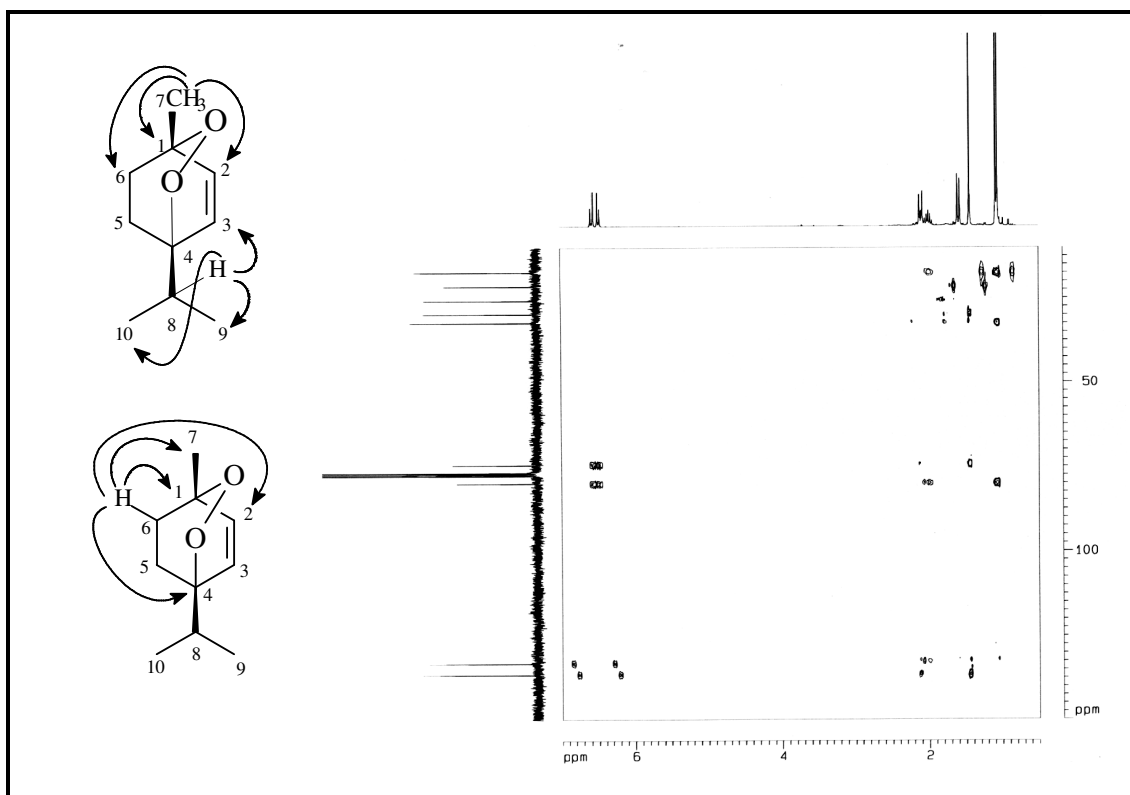


Figura 31 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMBC [300 e 75 MHz, CDCl_3] de CRB-1 (128)

3.2.1.2 – Determinação estrutural de CRFH-2 (130)

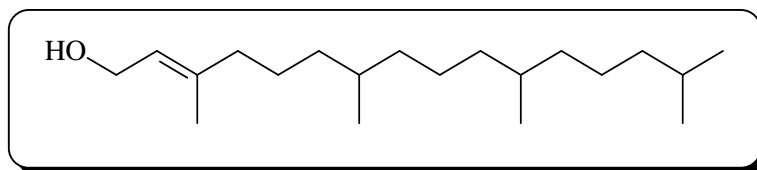
A fração CRFH-D2, oriunda da fração CH_2Cl_2 do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus*, obtida no item 4.4.3.1 (pág. 124), após sucessivas colunas cromatográficas do tipo flash (item 4.4.3.2, pág. 125), forneceu 16,9 mg de uma resina incolor, denominada de CRFH-2.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 32, pág. 42) mostrou vinte linhas espectrais, das quais dezoito correspondem a carbonos saturados e duas referentes a carbonos insaturados. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C -BB com o RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 33, pág. 42), revelou a presença de um carbono não hidrogenado, estando este na região de carbono olefínico; quatro carbonos metínicos, sendo um com hibridização sp^2 , dez carbonos metilênicos e cinco carbonos metílicos.

Estas informações juntamente com espectro de massas (Fig. 34, pág. 43), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, o qual forneceu o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 296 Daltons, permitiu sugerir para CRFH-2 a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$. Esta fórmula molecular apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a um, no qual foi atribuído a uma ligação dupla carbono-carbono. Estes dados indicaram que CRFH-2 tratava-se de um diterpeno de esqueleto linear.

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 35, pág. 43) apresentou apenas um hidrogênio na região de olefinas δ_{H} 5,41 (t, $J = 6,9$ Hz, H-2), caracterizando uma ligação dupla trissubstituída; um hidrogênio em δ_{H} 4,16 (d, $J = 6,9$ Hz, H-1) pertencente a carbono oxigenado e um número significativo de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos hibridizados sp^3 , revelando a natureza alifática do composto isolado.

A confirmação final da estrutura de CRFH-2, no entanto, envolveu principalmente a comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono obtidos pelos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° , com valores descritos na literatura para o diterpeno de esqueleto linear, fitol (Attaa-ur-rahman & Ahmad, 1992) (Tabela 12, pág. 41).

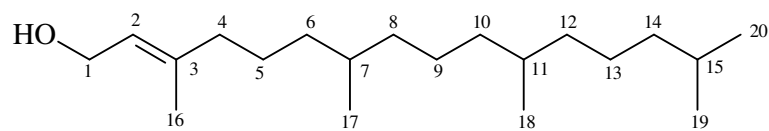


Fitol (130)

Tabela 12 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3) de CRFH-2

C	CRFH-2	Fitol *Lit
	δ_{C}	δ_{C}
1	59,6	59,4
2	123,1	123,4
3	140,3	139,9
4	40,1	39,9
5	25,4	25,5
6	36,9	36,8
7	32,9	32,8
8	37,7	37,5
9	24,7	24,6
10	37,6	37,5
11	33,0	32,9
12	37,5	37,4
13	25,0	24,8
14	39,6	39,5
15	28,2	28,0
16	16,4	16,2
17	19,9	19,8
18	19,9	19,8
19	22,8	22,6
20	22,9	22,7

* Deslocamentos químicos da literatura (Attaa-ur-rahman & Ahmad, 1992)



CRFH-2

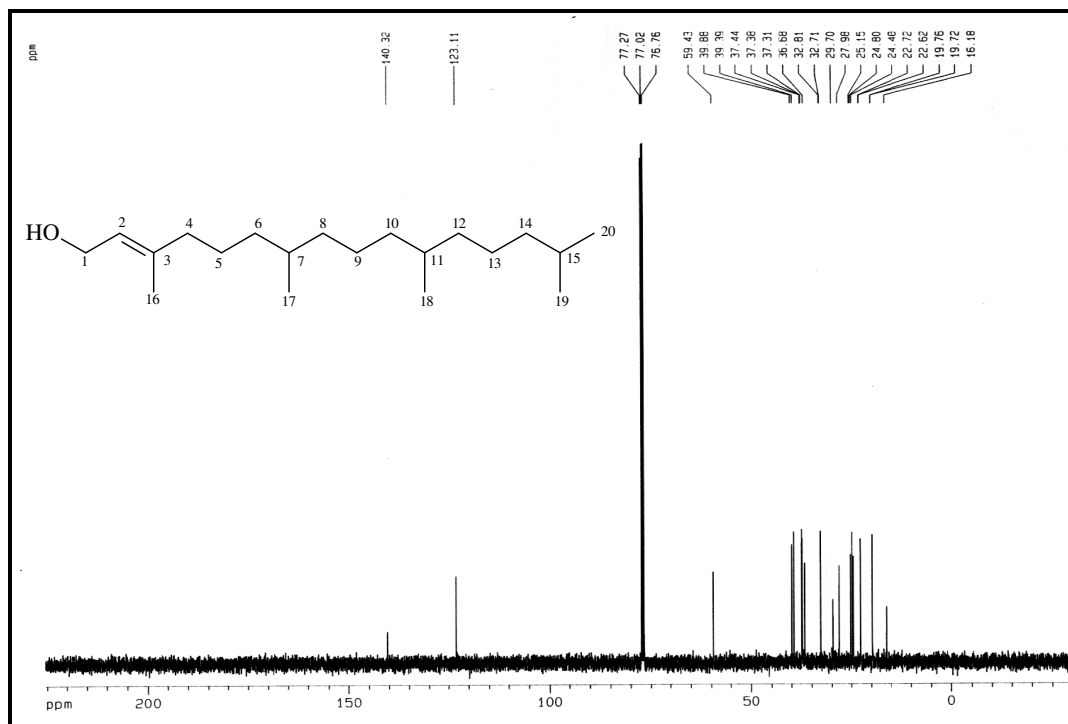


Figura 32 – Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CRFH-2

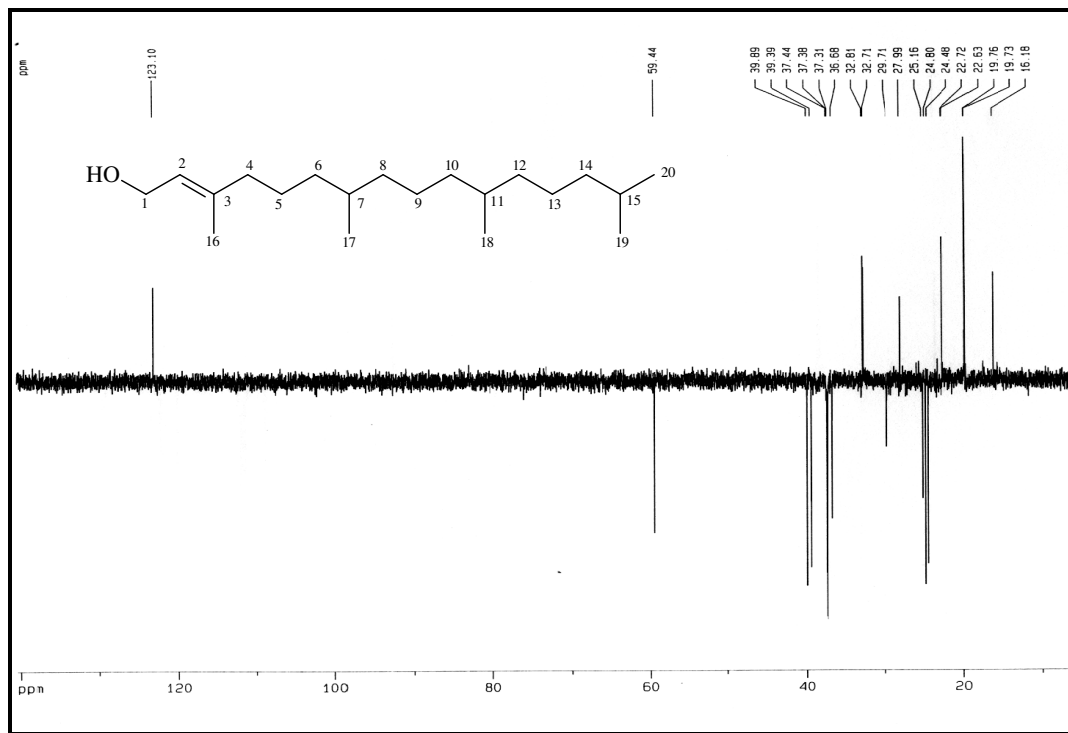


Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CRFH-2

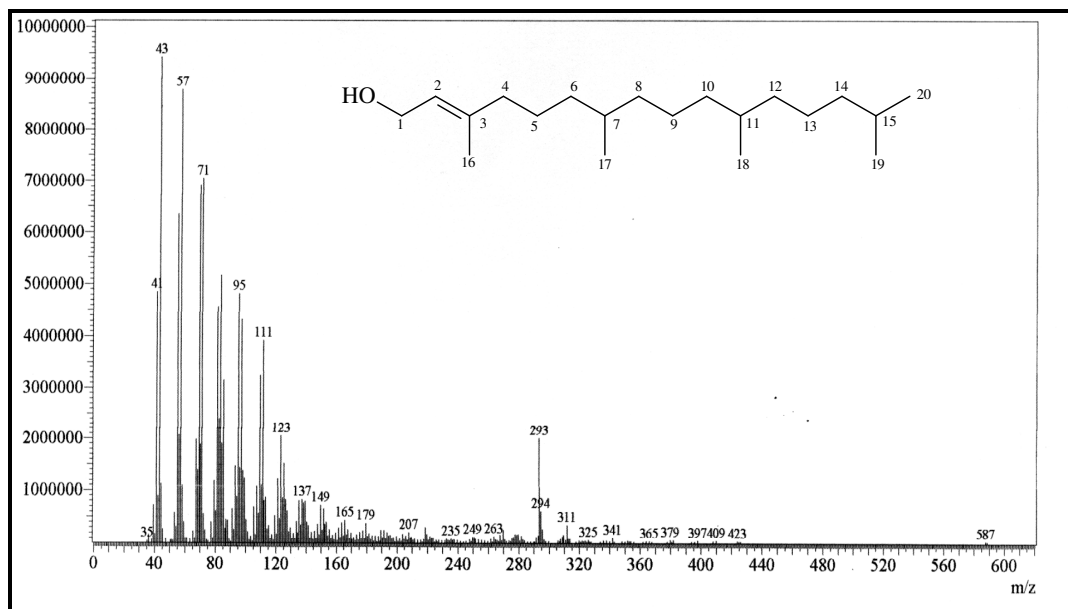


Figura 34 – Espectro de massas de CRFH-2

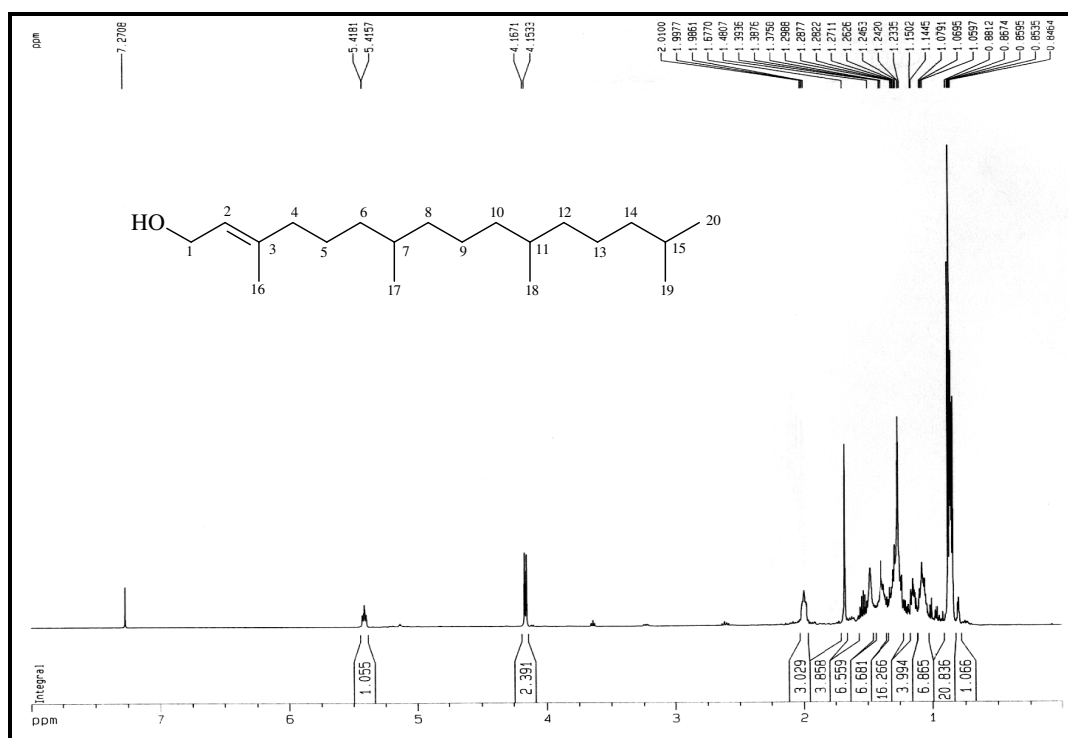


Figura 35 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CRFH-2

3.2.1.3 – Determinação estrutural de CRFH-4 (131)

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração AcOEt do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus* (item 4.4.3.5, pág.128, Fluxograma 3, pág. 130) levaram ao isolamento de 47,8 mg de um material cristalino, com ponto de fusão na faixa de 166,7-168,2 °C, denominado CRFH-4.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 36, pág.49) apresentou uma absorção larga centrada em 3417 cm⁻¹, associada à deformação axial de grupo hidroxila, absorções de deformação axial de ligação C-H em 2935 e 2866 cm⁻¹, e uma absorção em 1643 cm⁻¹ compatível com a presença de ligação dupla carbono-carbono. O caráter oxigenado foi confirmando pela presença de absorções em 1240 e 1191 cm⁻¹ correspondente a deformação axial de C-O de álcool.

O espectro de RMN ¹³C-BB [125 MHz, MeOD] (Fig. 37, pág. 49) mostrou dez linhas espectrais, sendo duas na região de carbonos olefínicos e as demais na região de carbonos saturados. Comparação deste com o espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (Fig. 38, pág. 50), revelou a presença de cinco carbonos metínicos, dos quais dois são referentes a carbonos oxigenados e um a carbono de dupla; um carbono metilênico; três carbonos metílicos e um carbono não-hidrogenado (Tabela 13).

Tabela 13 – Padrão de hidrogenação determinado através de análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C-BB e DEPT 135° de CRFH-4

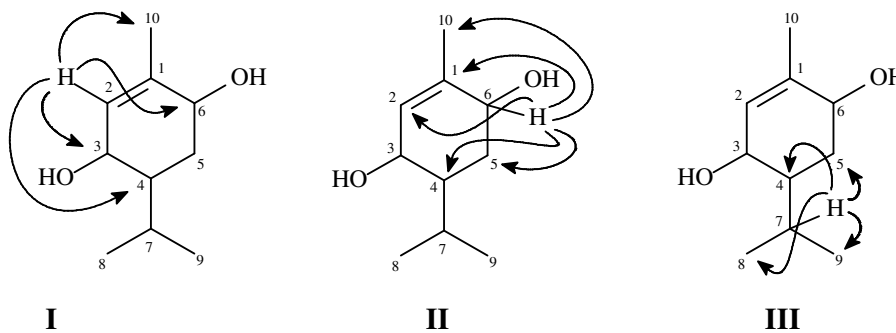
C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
137,4 (C=C)	131,1 (C=C)	31,1	20,8	
	70,1 (C-O)		21,5	
	68,6 (C-O)		17,8	
	43,0			
	27,2			
C	5CH	1CH ₂	3CH ₃	C ₁₀ H ₁₈ O ₂

O espectro de RMN ¹H [500 MHz, MeOD] (Fig. 39, pág. 50) revelou a presença de dois sinais na região de hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ_H 3,86 (d, *J* = 9,0 Hz, H-3) e 3,91 (sl, H-6); um singlete em δ_H 5,47 (H-2) referente a hidrogênio olefínico, sugerindo a existência de uma ligação dupla carbono-carbono trissubstituída. Um sinal em

δ_H 1,76 (s, 3H-10), indicando a existência de um grupamento metílico ligado a carbono olefínico e não-hidrogenado; além de sinais em δ_H 1,71 (dt, $J = 13,8$ e $4,1$ Hz, H_{α} -5) e 1,41 (td, $J = 13,8$ e $2,7$ Hz, H_{β} -5) correspondente a hidrogênios metilênicos. Adicionalmente o espectro exibiu sinais característicos de grupamento isopropila, através dos dubletos em δ_H 0,82 e 0,97 ($J = 7,0$ Hz, 3H-8/3H-9) e um multiplete com integração para um átomo de hidrogênio em δ_H 2,13 (H-7).

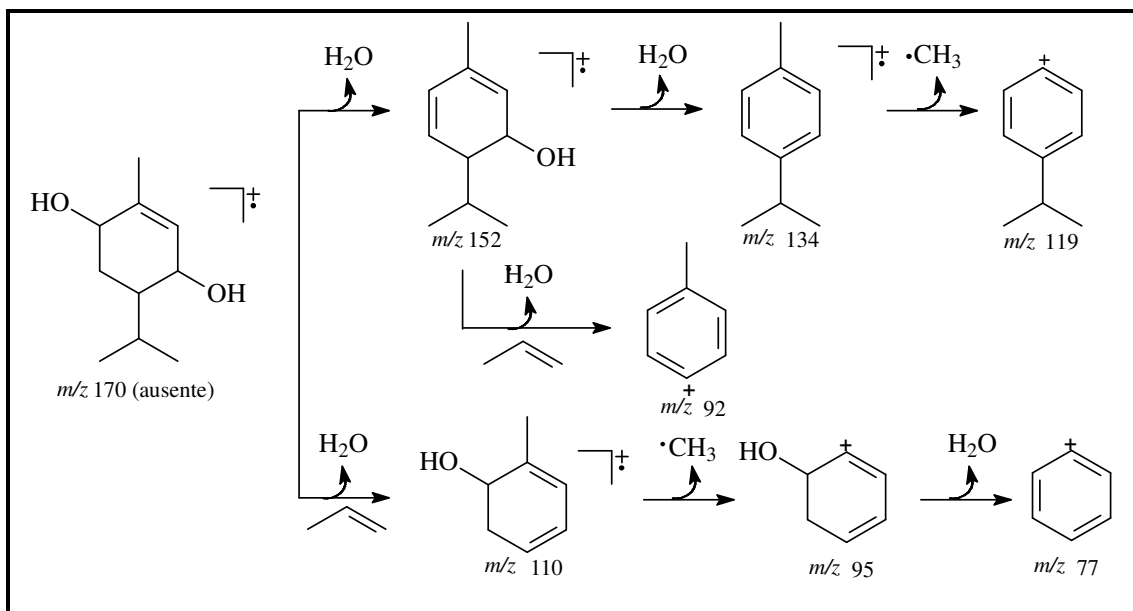
A partir da análise dos dados descritos (RMN 1H e de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135°) pode-se concluir que CRFH-4 tratava-se de um monoterpene cíclico, contendo dois grupos hidroxilas, um grupo metila e um grupo isopropila como substituintes. O espectro bidimensional de correlação heteronuclear 1H , ^{13}C a uma ligação – HSQC (Fig. 40 e 41, pág. 51), permitiu associar seguramente os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 14, pág. 48).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear a duas ($^2J_{CH}$) e três ligações ($^3J_{CH}$) – HMBC (Fig. 42, 43 e 44 pág. 52 e 53) foi decisivo na atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos, inclusive corrigir os deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos C-8 e C-10, os quais encontravam-se trocados na literatura (Li, 2002), (Tabela 14, pág. 46). Através deste experimento, observou-se correlações a longa distância entre o hidrogênio olefínico em δ_H 5,47 (H-2) com os carbonos em δ_C 70,3 (C-3, $^2J_{CH}$), 68,6 (C-6, $^3J_{CH}$), 43,0 (C-4, $^3J_{CH}$) e 20,8 (C-10, $^3J_{CH}$) (estrutura **I**); bem como do hidrogênio em δ_H 3,91 (H-6) com os carbonos em δ_C 137,4 (C-1, $^2J_{CH}$), 131,1 (C-2, $^3J_{CH}$), 43,0 (C-4, $^3J_{CH}$), 31,1 (C-5, $^2J_{CH}$) e 20,8 (C-10, $^3J_{CH}$) (estrutura **II**) justificando assim a dupla ligação na posição 1 e os dois grupos hidroxilas nas posições 3 e 6. As correlações observadas do hidrogênio metínico em δ_H 2,13 (H-7) com os carbonos em δ_C 17,2 (C-8, $^2J_{CH}$), 21,5 (C-9, $^2J_{CH}$), 43,0 (C-4, $^2J_{CH}$) e 31,1 (C-5, $^3J_{CH}$), confirmaram a posição do grupo isopropila (estrutura **III**).



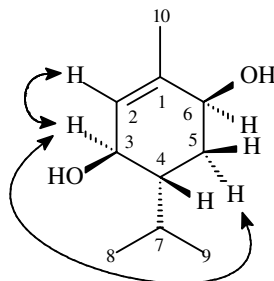
A estrutura proposta foi confirmada também através do espectro ^1H , ^1H - COSY (Fig. 45, pág 53), onde pode-se observar o acoplamento vicinal do hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,47 (s, H-2), com o hidrogênio em δ_{H} 3,86 (d, $J = 9,0$ Hz, H-3); e dos hidrogênios em δ_{H} 1,71 (dt, $J=13,8$ e $2,6$ Hz, $\text{H}_{\beta-5}$) e 1,41 (td, $J = 13,8$ e $4,1$ Hz, $\text{H}_{\alpha-5}$), com hidrogênio em δ_{H} 3,91 (s, H-6).

O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig 47, pág. 54), evidenciou esta estrutura quando mostrou os picos em m/z 152 e 134 Daltons compatível com a perda de uma ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}$) e duas moléculas de água ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$), respectivamente, caracterizando o caráter dihidroxilado de CRFH-4. O quadro 1, a seguir resume os principais fragmentos observados no espectro de massa de CRFH-4.



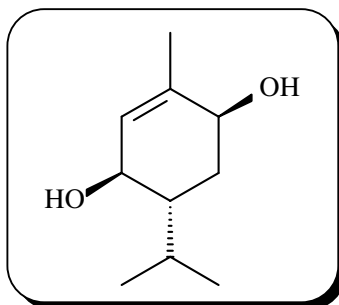
Quadro 1 - Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de CRFH-4.

A estereoquímica dos estereocentros C-3, C-4 e C-6, foi determinada através do espectro bidimensional ^1H , ^1H - NOESY (Figura 46, pág. 54) o qual revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ_{H} 3,86 (H-3) com os hidrogênios em δ_{H} 5,47 (H-2) e 1,41 ($\text{H}_{\alpha-5}$), indicando uma relação *cis* entre os grupos hidroxilas situados nos carbonos C-3 e C-6. O grupo isopropila, ligado ao carbono C-4, mantendo uma relação *trans* aos grupos hidroxilas, justifica a ausência de qualquer interação entre o hidrogênio em δ_{H} 1,59 (H-4) com os hidrogênios em δ_{H} 3,86 (H-3), 3,91 (H-6) e 1,41 ($\text{H}_{\alpha-5}$).



Com base nos dados discutidos incluindo análise comparativa com dados descritos na literatura chegou-se a conclusão que CRFH-4 se trata do monoterpene conhecido por (3*R*,4*R*,6*S*)- 3,6-dihidroxi-1-menteno (Li, 2003). Com a seguinte nomenclatura sistemática: (1*S*,4*R*, 5*R*)-2-ciclohexeno-1,4, diol, 2-metil-5 (1-metiletil).

Este metabólito secundário, apesar de já possuir registro na literatura, esta sendo descrito pela primeira vez no gênero *Croton*.



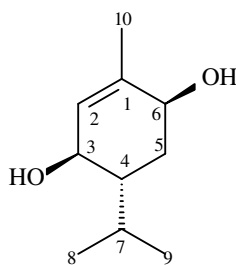
(3*R*.4*R*.6*S*)- 3.6-Dihidroxi-1-menteno (**131**)

Tabela 14 – Deslocamentos químicos de (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de CRFH-4

C	HSQC		HSQC *Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	137,4	-	137,0	-
2	131,1	5,47 (s)	129,7	5,53 (s)
3	70,1	3,86 (d; 9,0)	69,3	3,85 (dd; 9,0)
4	43,0	1,59 (t; 12,4)	42,5	1,74 (m)
5	31,1	1,71(dt; 13,8/2,6) 1,41 (td; 13,8/4,1)	29,9	1,44 (m)
6	68,6	3,91 (sl)	67,9	3,98 (t; 3,0)
7	27,2	2,13 (m)	26,3	2,10 (d; 7,3)
8	17,2	0,82 (d; 7,0)	20,4*	0,97 (d; 7,0)
9	21,5	0,96 (d; 7,0)	20,9	0,84 (d; 7,0)
10	20,8	1,76 (s)	17,1*	1,80 (s)

Deslocamentos químicos δ_{C} e δ_{H} em ppm e constante de acoplamento (J , entre parêntese) em Hz

* Valores trocados na literatura (Li, 2003).



CRTH-4

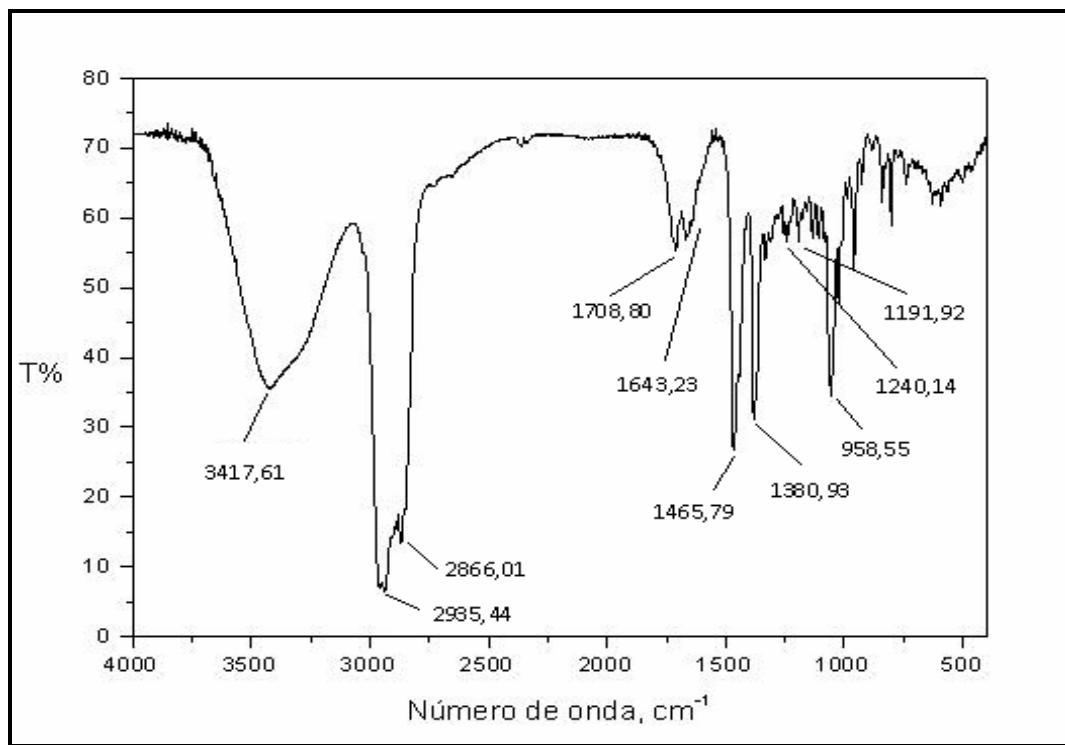


Figura 36 – Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm^{-1}) de CRFH-4 (131)



Figura 37 – Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

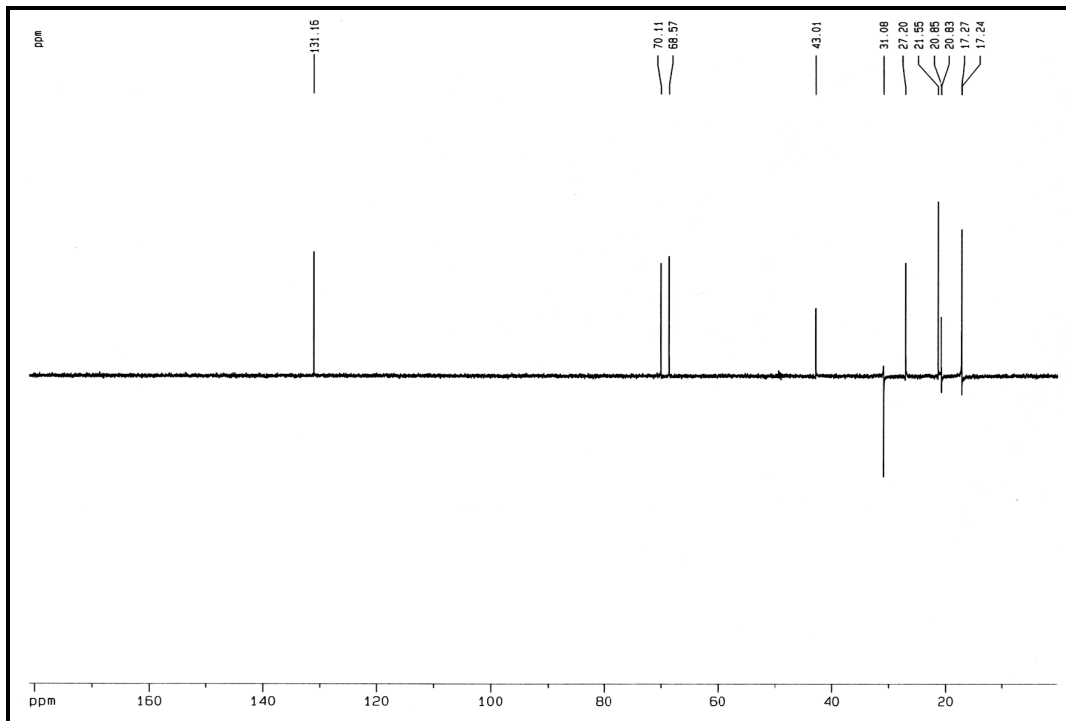


Figura 38 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (**131**)



Figura 39 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (**131**)

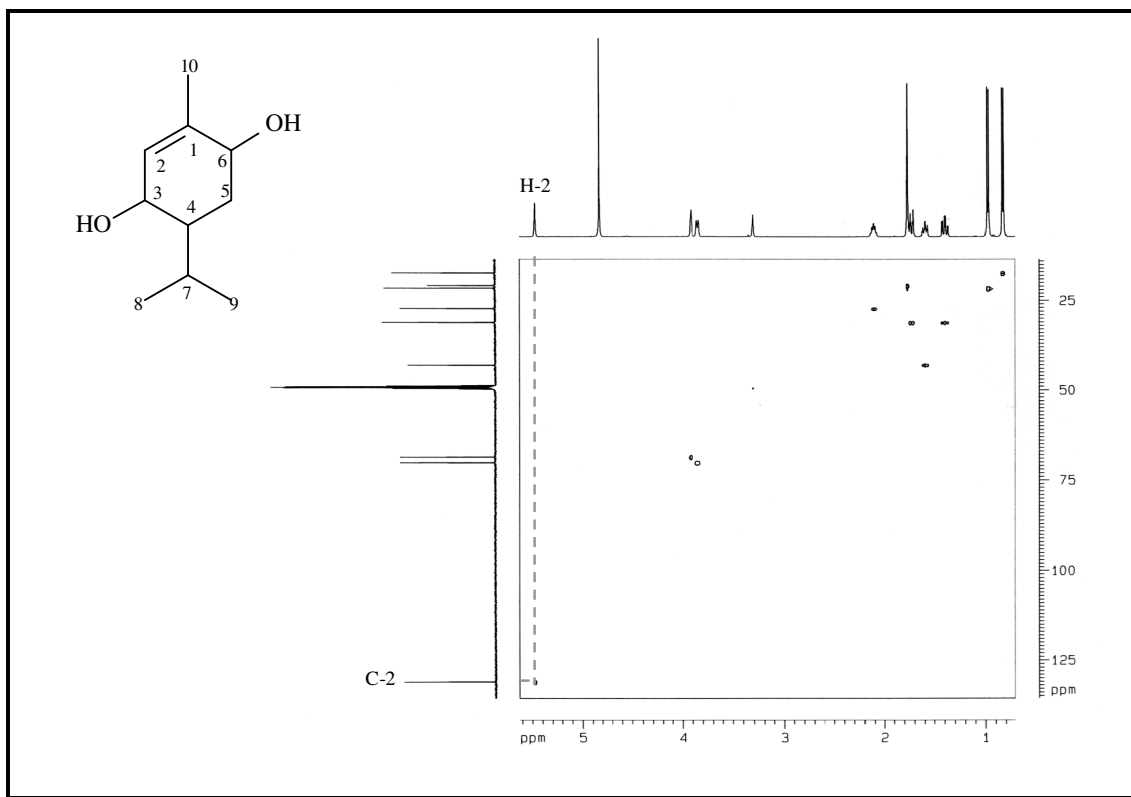


Figura 40 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HSQC [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (**131**)

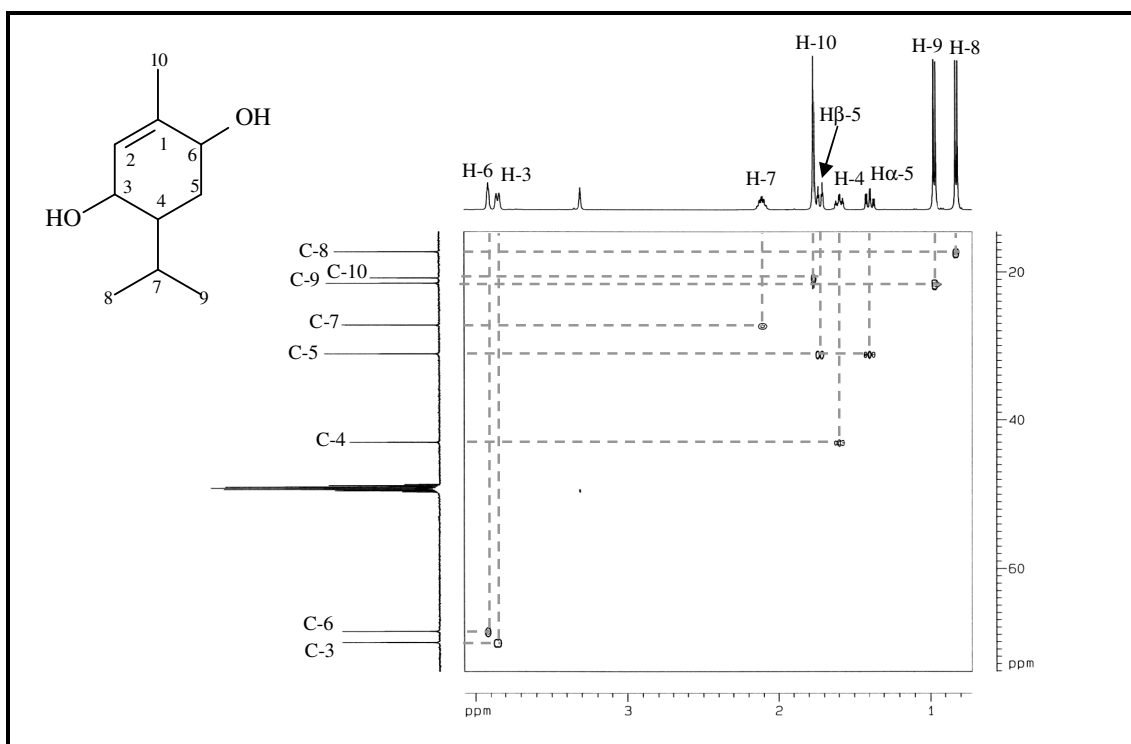


Figura 41 – Espectro HSQC-expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (**131**)

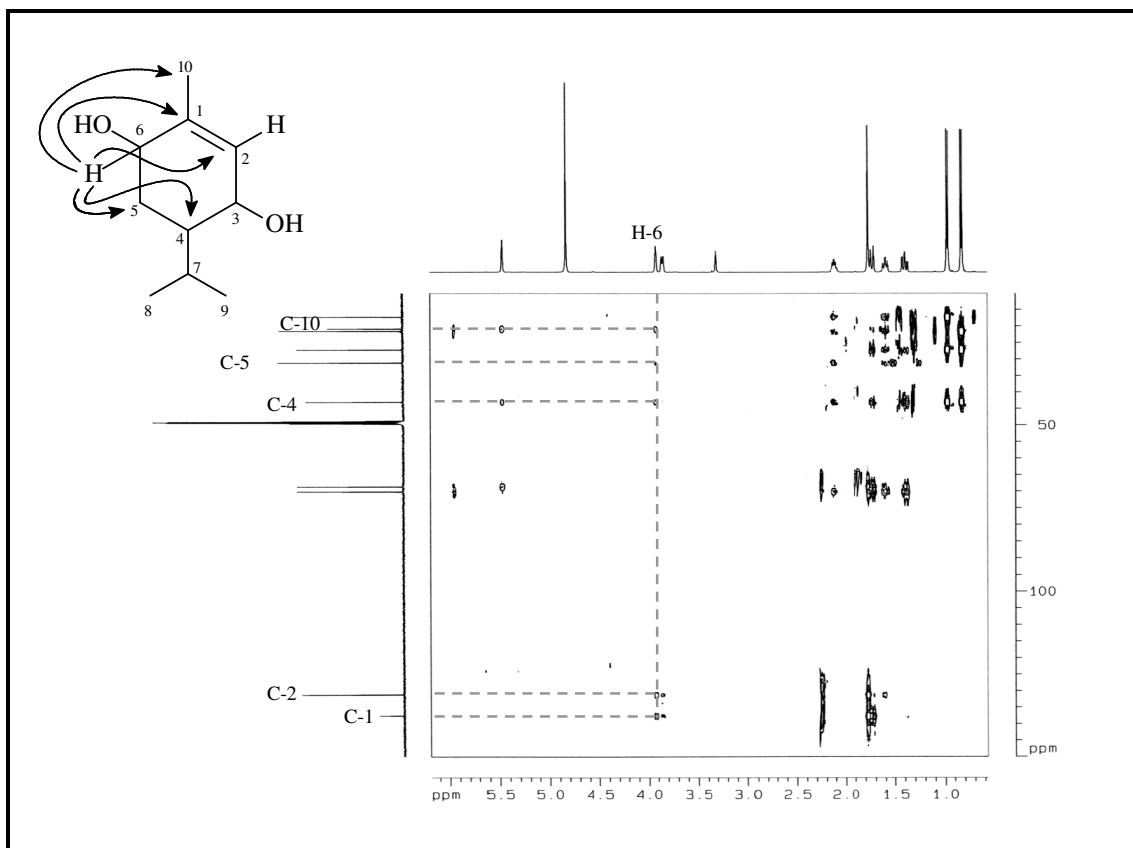


Figura 42 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMBC [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

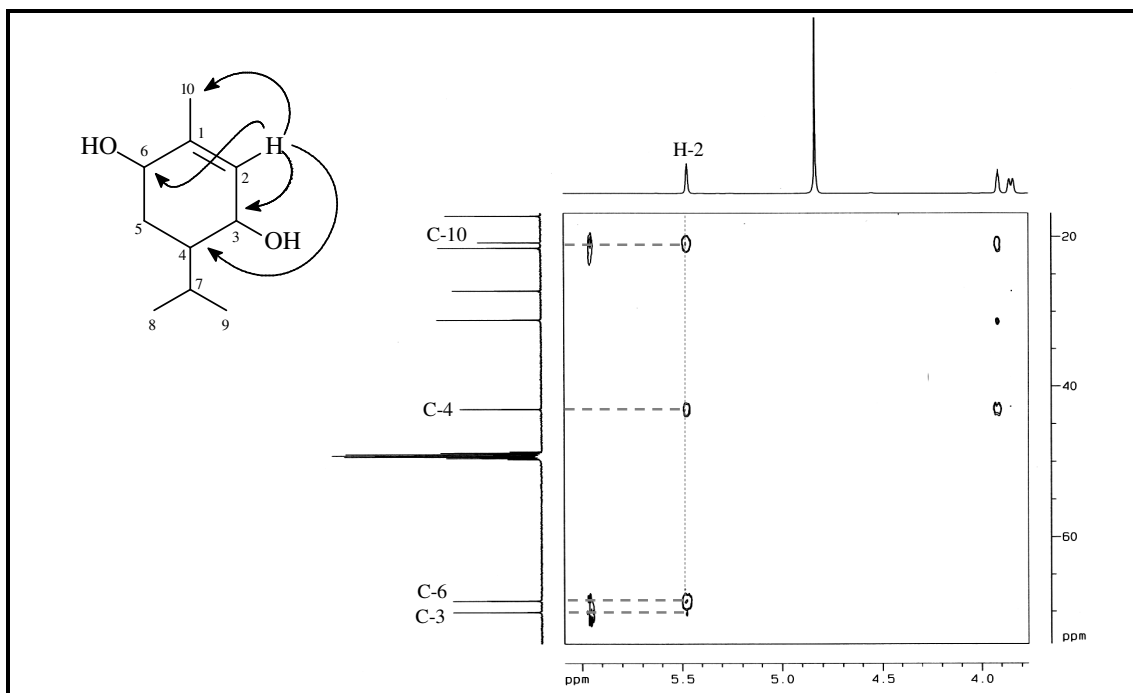


Figura 43 – Espectro HMBC – expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

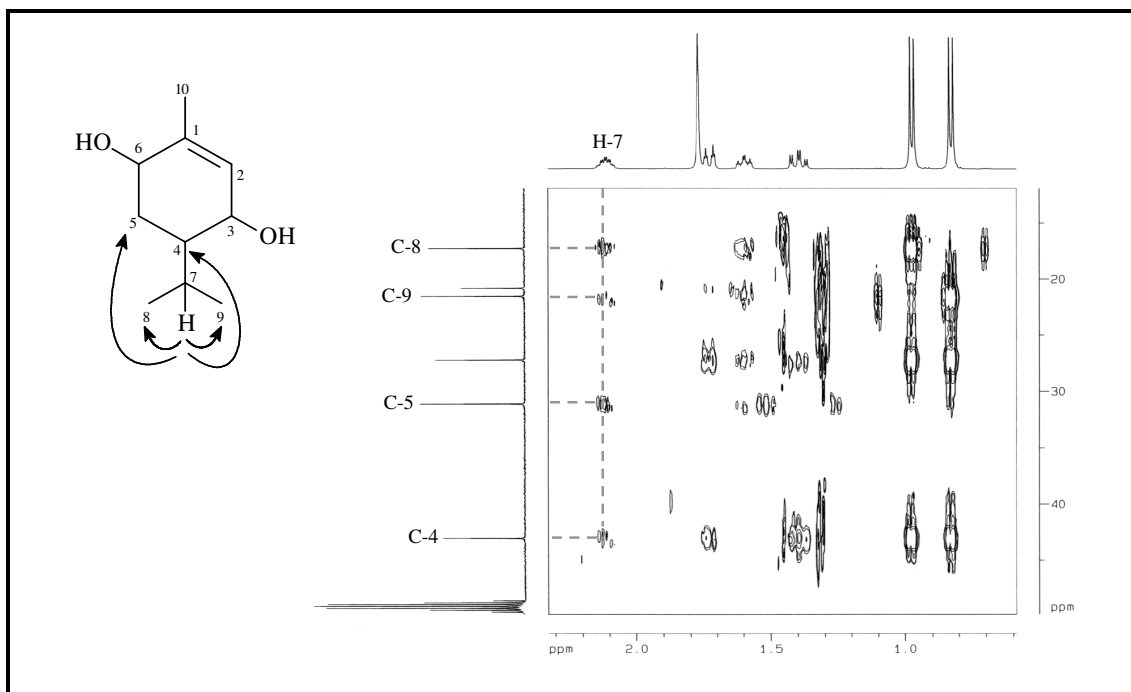


Figura 44 – Espectro de HMBC – expansão [500 e 125 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

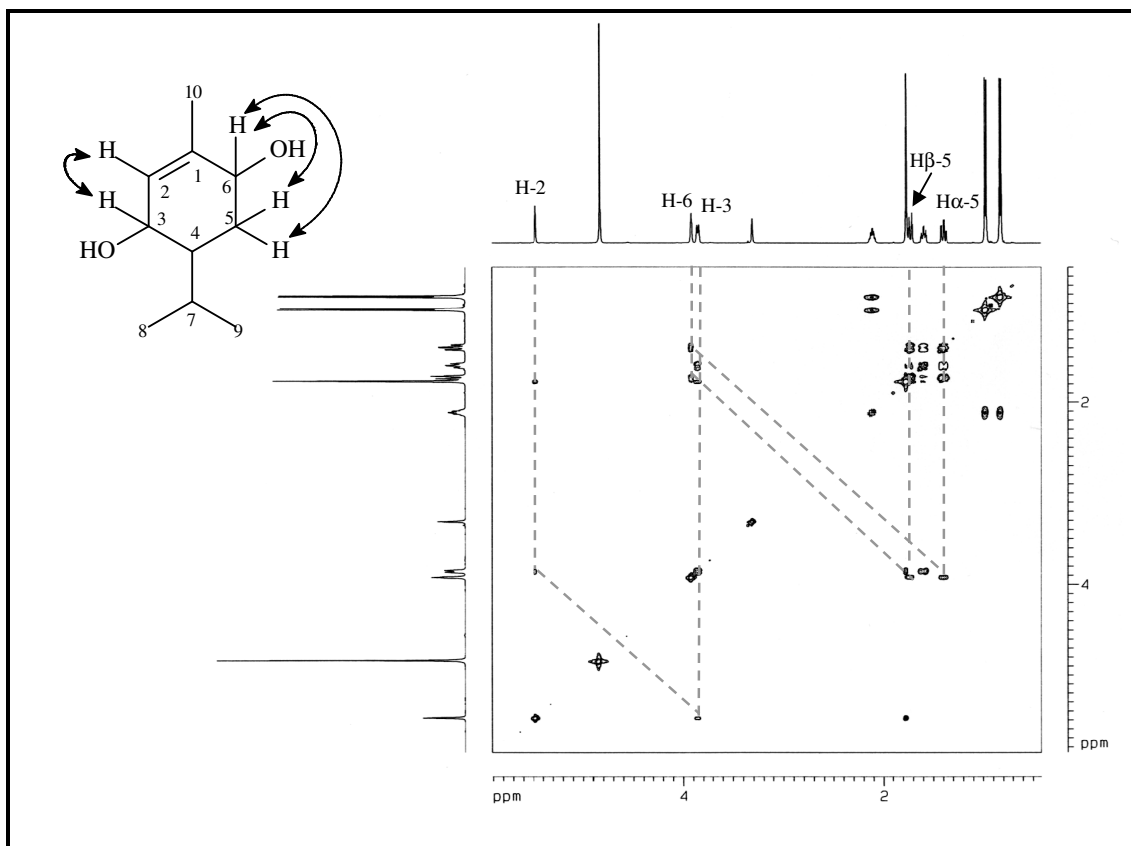


Figura 45 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY- [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

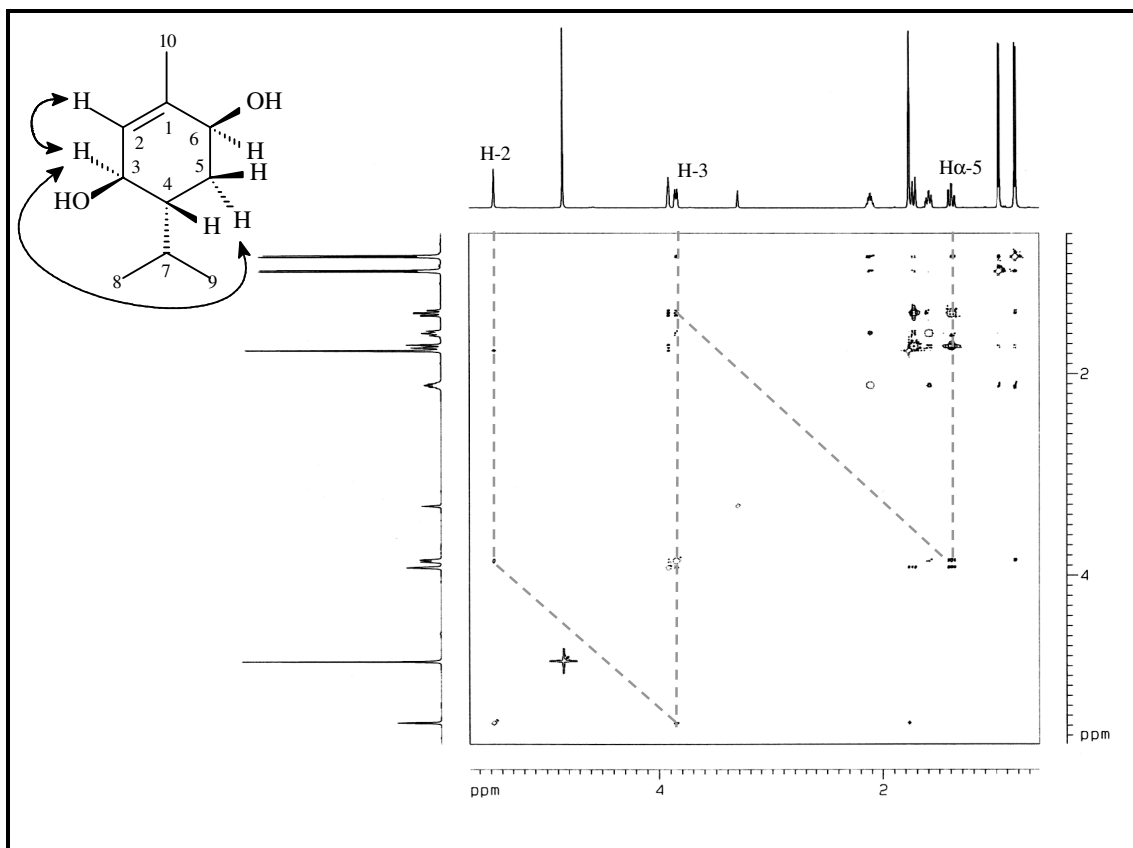


Figura 46 – Espectro de RMN ^1H , ^1H - NOESY [500 MHz, MeOD] de CRFH-4 (131)

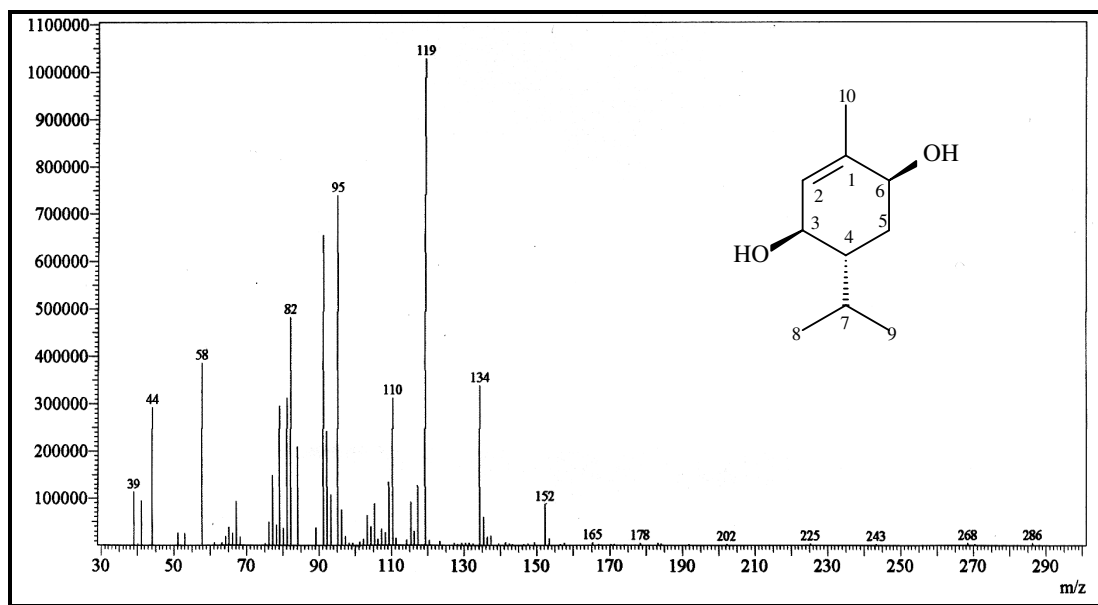


Figura 47 – Espectro de massas de CRFH-4 (131)

3.2.1.4 - Determinação estrutural de CRTH-4 (132)

Da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus* (item 4.4.5.1, pág. 135, Fluxograma 5, pág. 139), após sucessivas cromatografias, incluindo CLAE, foi obtido uma resina (6,8 mg) amarela clara, denominada CRTH-4.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 48, pág. 61) revelou uma banda larga em 3412 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação OH; bandas em 2933 a 2868 cm^{-1} , de deformação axial da ligação C-H de grupamentos metílico e metilênico. Observou-se também uma bandas em 1727 e 1710 cm^{-1} , associada à deformação axial de ligação dupla C=O, podendo ser de carbonilas de cetona, além de uma banda em 1638 cm^{-1} associada à deformação axial de ligação dupla C=C de alceno.

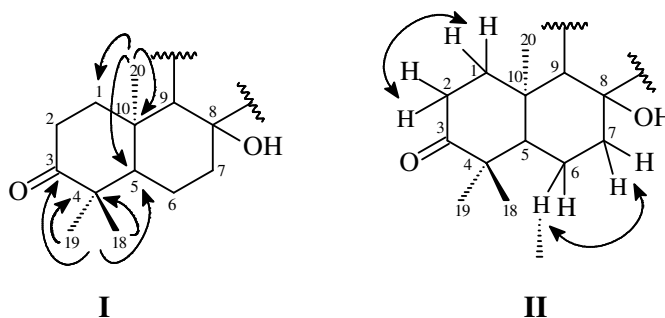
A análise do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 49, pág. 61) evidenciou sinais de hidrogênios para quatro grupamentos metílicos em δ_{H} 1,12 (s, 3H-18); 1,16 (s, 3H-19); 1,59 (s, 3H-20) e 1,88 (sl, 3H-16), sendo o último característico de hidrogênios de grupo metila ligado a carbono sp^2 ; sinais para hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,04 (s, H-11) e 6,53 (s, H-17), atribuídos a hidrogênios de dupla ligação e uma série de sinais na faixa de δ_{H} 1,43 a 2,83; característicos de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , evidenciando a natureza terpênica de CRTH-4.

O espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 50, pág. 62) apresentou sinais correspondentes a dezoito átomos de carbono, sendo sete carbonos não-hidrogenados (δ_{C} 215,4; 186,1; 167,5; 133,1; 69,2; 48,2 e 40,8), três carbonos metínicos (δ_{C} 148,2; 122,6 e 54,3), quatro carbonos metilênicos (δ_{C} 39,0; 36,3; 34,4 e 18,6) e quatro carbonos metílicos (δ_{C} 26,2; 22,2; 19,7 e 15,1) (Tabela 15, pág. 56). Entre os seis sinais referentes a carbono sp^2 , dois foram compatíveis com carbonilas de cetona, uma delas (δ_{C} 186,1) fazendo parte de um sistema α , β - insaturado. Os outros quatro sinais (δ_{C} 133,1; 122,6; 148,2 e 167,5) foram atribuídos aos carbonos α e β , respectivamente, de dois sistemas conjugados a carbonila.

Através do espectro HSQC (Fig. 51, pág. 62) foi possível associar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono e construir a Tabela 16 (pág. 60).

O espectro bidimensional HMBC (Figs. 52 e 53, pág. 63) mostrou correlações a longa distancia dos hidrogênios referentes a grupos metilas geminais em δ_{H} 1,12 (s, 3H-18) e 1,16 (s, 3H-19) com os carbonos em δ_{C} 215,4 (C-3, $^3\text{J}_{\text{CH}}$); 48,2 (C-4, $^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 54,3 (C-5, $^3\text{J}_{\text{CH}}$), bem como a correlação entre os hidrogênios do grupo metílico em δ_{H} 1,59 (s, 3H-

20) com os carbonos em δ_C 32,3 (C-1, $^3J_{CH}$); 54,3 (C-5, $^3J_{CH}$) e 40,8 (C-10, $^2J_{CH}$). De acordo com os dados discutidos acima, pode-se inferir para a estrutura de CRTH-4 a presença de um sistema tipo decalina contendo três grupos metilas, sendo dois geminais e adjacentes a um grupo carbonila, isto em C-4, e o outro na posição 10, conforme mostra a sub-estrutura (I). Esta sub-estrutura foi corroborada através dos acoplamentos vicinais dos hidrogênios metilênicos em δ_H 2,06 e 1,90 (2H-1) com os hidrogênios em δ_H 2,85 e 2,53 (H-2), assim como os acoplamentos dos hidrogênios em δ_H 2,17 e 1,65 (2H-6) com os hidrogênios em δ_H 2,13 e 1,45 (2H-7) e 1,43 (H-5) (sub-estrutura II) observados no espectro COSY (Fig. 54, pág. 63).



As correlações a longa distancia, observadas no espectro HMBC entre o sinal relativo ao hidrogênio olefínico em δ_H 6,53 (s, H-14) com os carbonos em δ_C 69,2 (C-8); 189,1 (C-12) e 15,14 (C-17), aliados aos sinais de hidrogênios e carbonos para duas duplas ligações trissubstituídas, incluindo um grupo metila ligado a um carbono sp^2 , e ainda um sinal de carbono relativo a uma carbonila conjugada, permitiu a construção da sub-estrutura (III), na qual foi posicionada entre os carbonos C-9 e C-8 em função das correlações observadas entre o hidrogênio em δ_H 6,04 (s, H-11) com os carbonos em δ_C 167,5 (C-9, $^2J_{CH}$); 69,2 (C-8, $^3J_{CH}$) e 40,8 (C-10 $^2J_{CH}$) (estrutura IV).

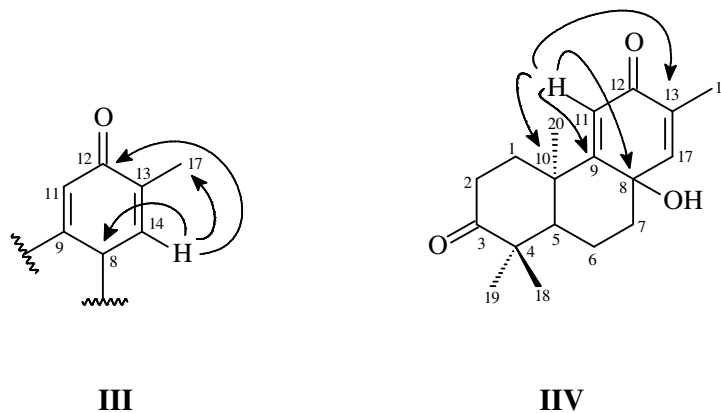
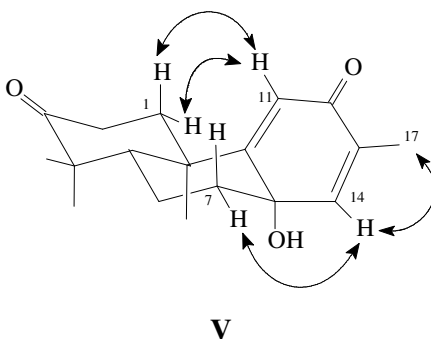


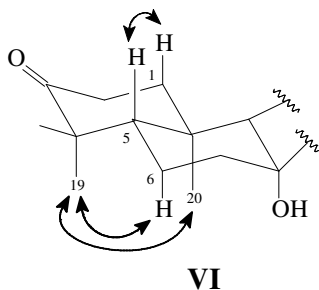
Tabela 15 – Padrão de hidrogenação determinado através da análise do espectro de RMN ^{13}C -APT

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
215,4	148,2	39,1	26,2	
189,1	122,6	36,3	22,1	
167,5	54,3	34,4	19,7	
133,1		18,6	15,1	
69,2				
48,2				
40,8				
7C	3CH	4CH₂	4CH₃	C₁₈H₂₄O₃
O número de átomos de oxigênio foi deduzido com base no deslocamento de cada átomo de carbono				

A configuração relativa inferida para o grupo hidroxila, ligado ao carbono C-8, foi deduzida através do espectro NOESY (Figs. 55 e 56, págs. 64 e 65), o qual revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ_{H} 6,53 (H-14) com os hidrogênios em δ_{H} 2,13 (H α -7) e 1,88 (3H-17), bem como do hidrogênio em δ_{H} 6,04 (H-11) com os hidrogênios em δ_{H} 1,90 (H α -1) e 2,06 (H β -1). Estas interações justificaram a configuração α para o grupo hidroxila (sub-estrutura **V**).



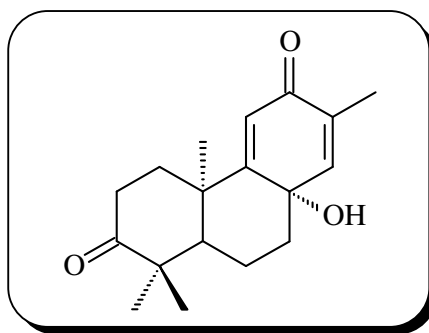
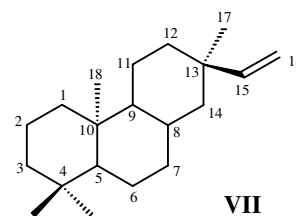
Ainda através deste espectro foi possível determinar a estereoquímica dos estereocentros C-5 e C-10, em função das interações dipolares observadas entre o hidrogênio em δ_{H} 1,43 (H-5) com o hidrogênio em δ_{H} 1,90 (H β -1) e entre os hidrogênios em δ_{H} 1,16 (3H-19) com os hidrogênios em δ_{H} 1,65 (H α -6) e 1,59 (3H-20) (sub-estrutura **VI**)



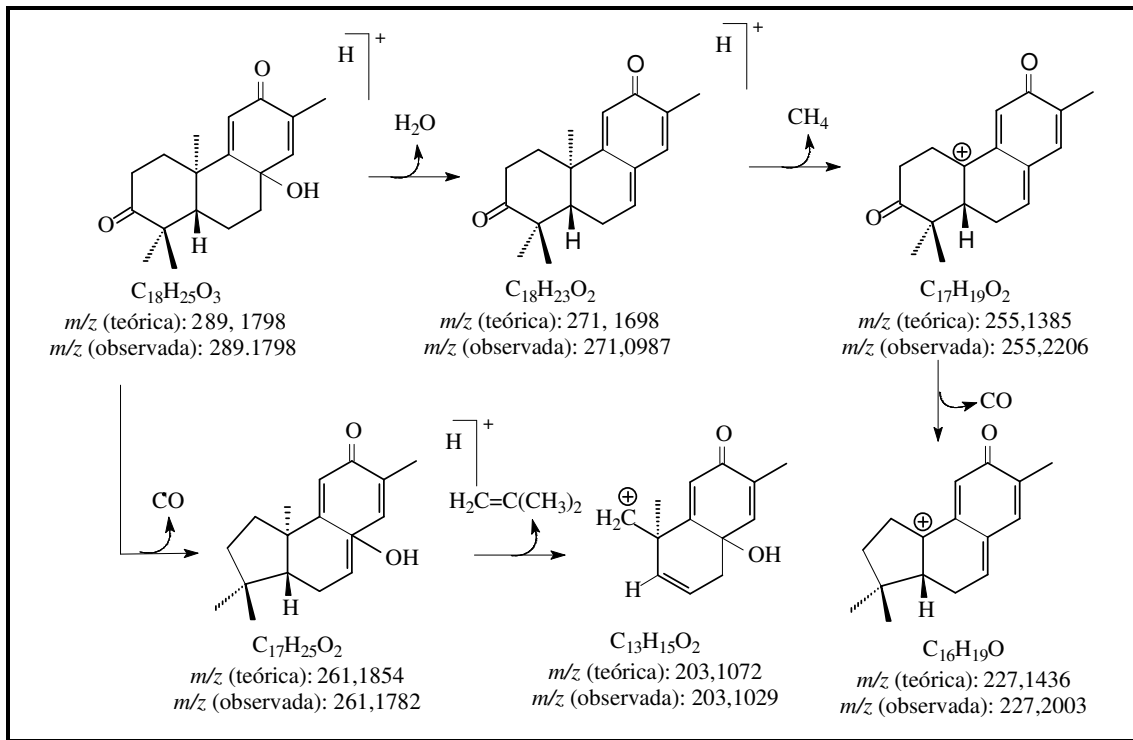
O espectro de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EM-EIS) (Fig. 57, pág. 65), o qual forneceu o pico em m/z 289,1798 Daltons, compatível com o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$, bem como os fragmentos observado no espectro EM/EM-EIS (Fig. 58, pág. 66), ilustrados no quadro 2 (pág. 59) foram de extrema importância para elucidação estrutural de CRTH-4.

Com base nos dados de RMN e EM-EIS foi possível propor para CRFH-4 a estrutura de um norditerpeno, com fórmula molecular $C_{18}H_{24}O_3$, cuja nomenclatura sistemática é (4a*S*,8a*S*,-)4,4a,8a,9,10,10a-hexahidro-8a-hidroxi-1,1,4a,7-tetrametilfenantreno-2,6(1*H*,3*H*,-)diona (**132**). É importante ressaltar que esta estrutura está sendo relatada pela primeira vez na literatura.

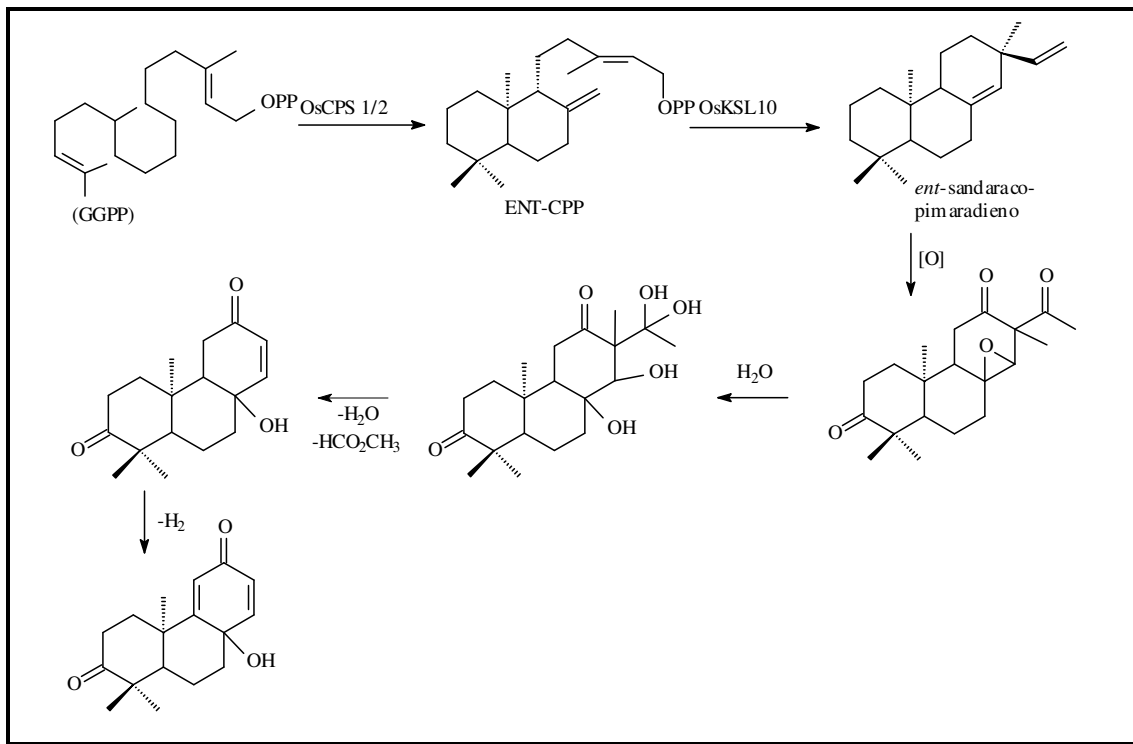
Este norditerpeno pode ter sido biossintetizado a partir de um diterpeno de esqueleto pimarano (estrutura **VII**), pela perda de dois átomos de carbono (C-15 e C-16). No quadro 3 (pág. 59) é mostrado uma proposta biogenética para formação de CRTH-4, justificando a perda dos átomos de carbonos C-15 e C-16, do pimarano original. A rota biogenética proposta baseou-se na formação do *ent*-sandaraco-pimaradieno (quadro 3, pág. 59), o qual foi biossintetizado a partir do GGPP (Xu *et al.*, 2007). Vale salientar que a possibilidade deste composto ser derivado de diterpenos com esqueletos isopimarano, cassano e cleistantano, não deve ser descartada.



(132)



Quadro 2 - Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de CRTH-4.



Quadro 3 – Rota biogenética proposta para formação de CRTH-4 a partir de um diterpeno de esqueleto pimarano.

Tabela 16 – Deslocamentos químicos de (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de CRTH-4

C	HSQC		$^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$ e $^4J_{\text{CH}}$
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$		
1	32,3	2,06; 1,90		
2	34,4	2,83 (m); 2,53 (m)		
3	215,4	-	2H-2	3H-18; 3H-19; H-1a
4	48,2	-	3H-18; 3H-19 ;H-5	
5	54,3	1,43	2H-6	3H-18; 3H-19; 3H-20; 2H-7
6	18,6	2,17; 1,65	H-5, 2H-7	
7	39,1	2,13; 1,45	H-6a	
8	69,2	-		H-11
9	167,5	-	H-11	H-14
10	40,8	-	3H-20; H-1b; H-11	2H-2; 2H-6; H-11
11	122,6	6,04 (s)		
12	189,2	-	H-11	H-14; 3H-16
13	133,1	-		H-11
14	148,2	6,53 (sl)		3H-17
17	15,1	1,88 (sl)		H-14
18	26,2	1,12 (s)		3H-19; H-5
19	22,2	1,16 (s)		3H-18; H-5
20	19,7	1,59 (s)		H-1b; H-5

^a500 MHz; ^b 125 MHz

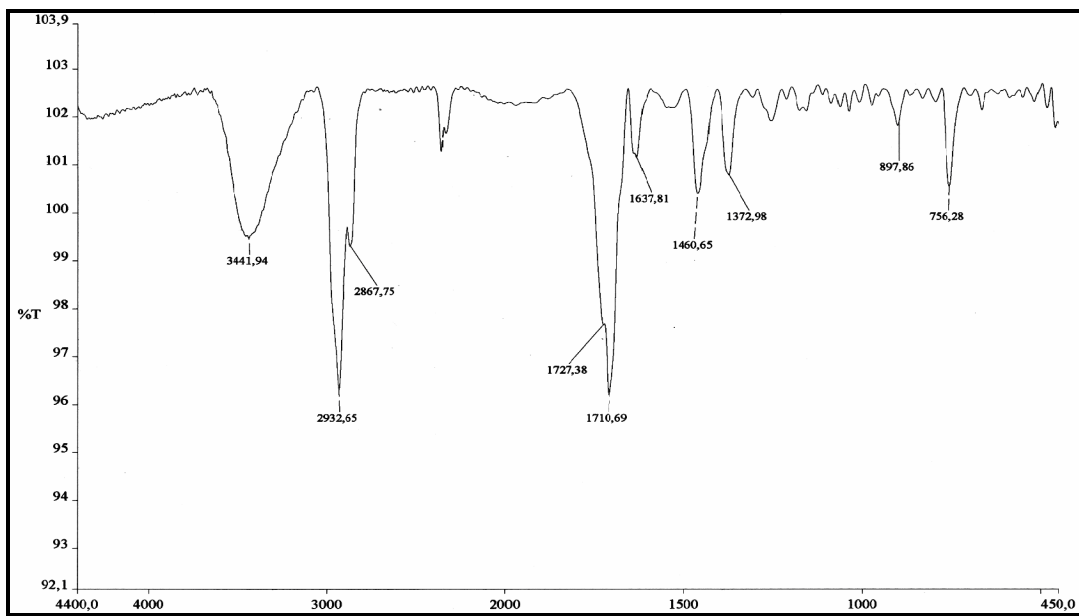


Figura 48 – Espectro de absorção na região do IV (NaCl , cm^{-1}) de CRTH-4 (132)

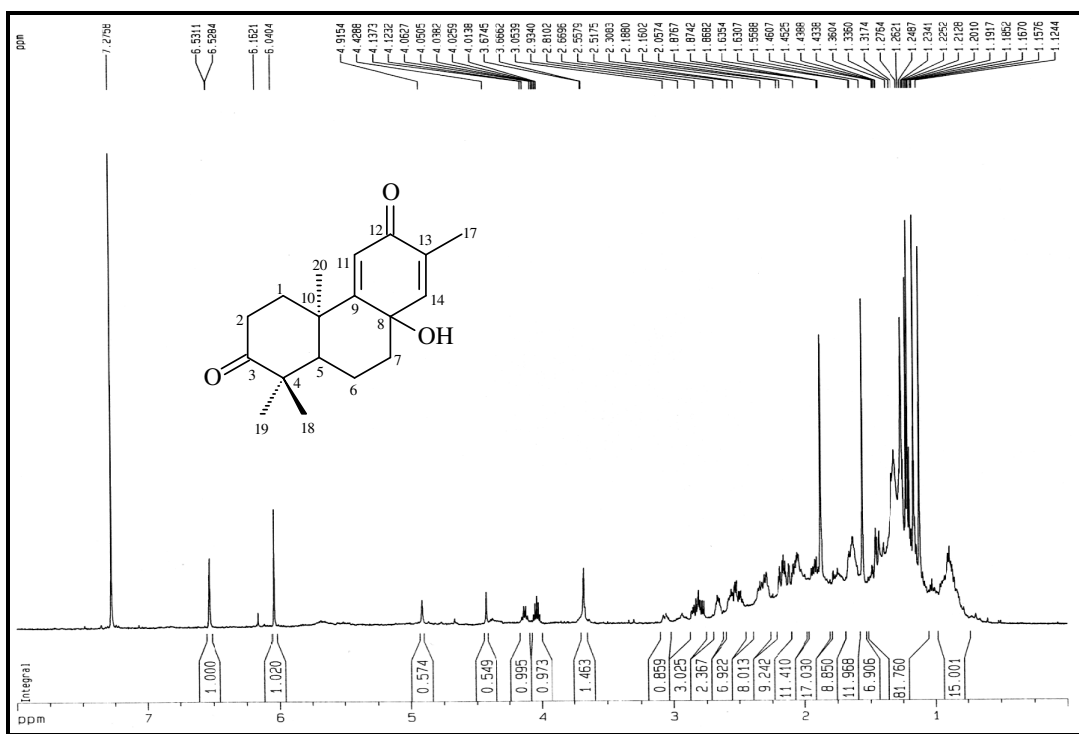


Figura 49 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

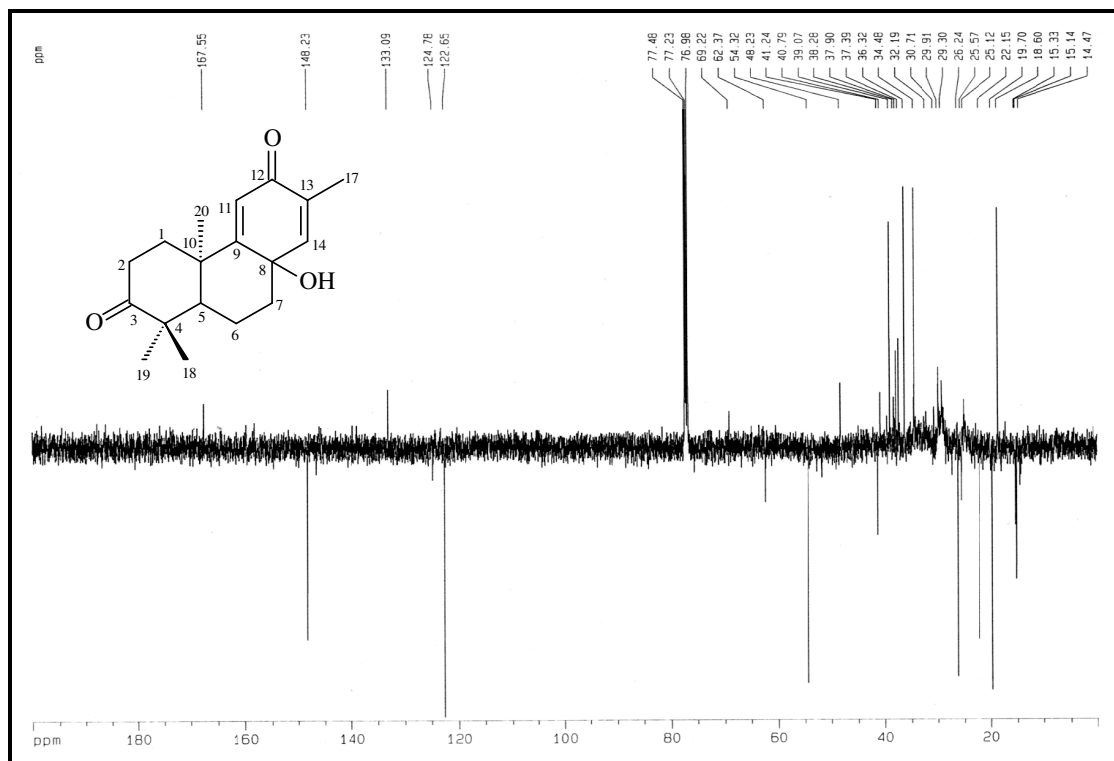


Figura 50 – Espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (**132**)

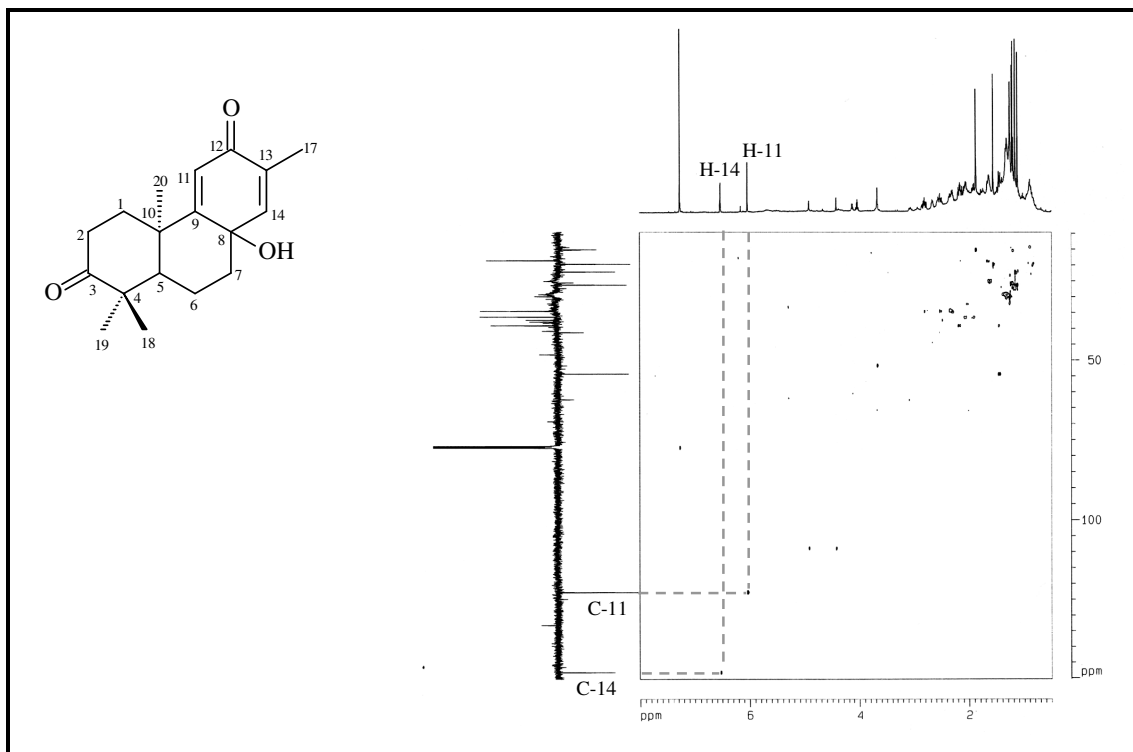


Figura 51 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HSQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (**132**)

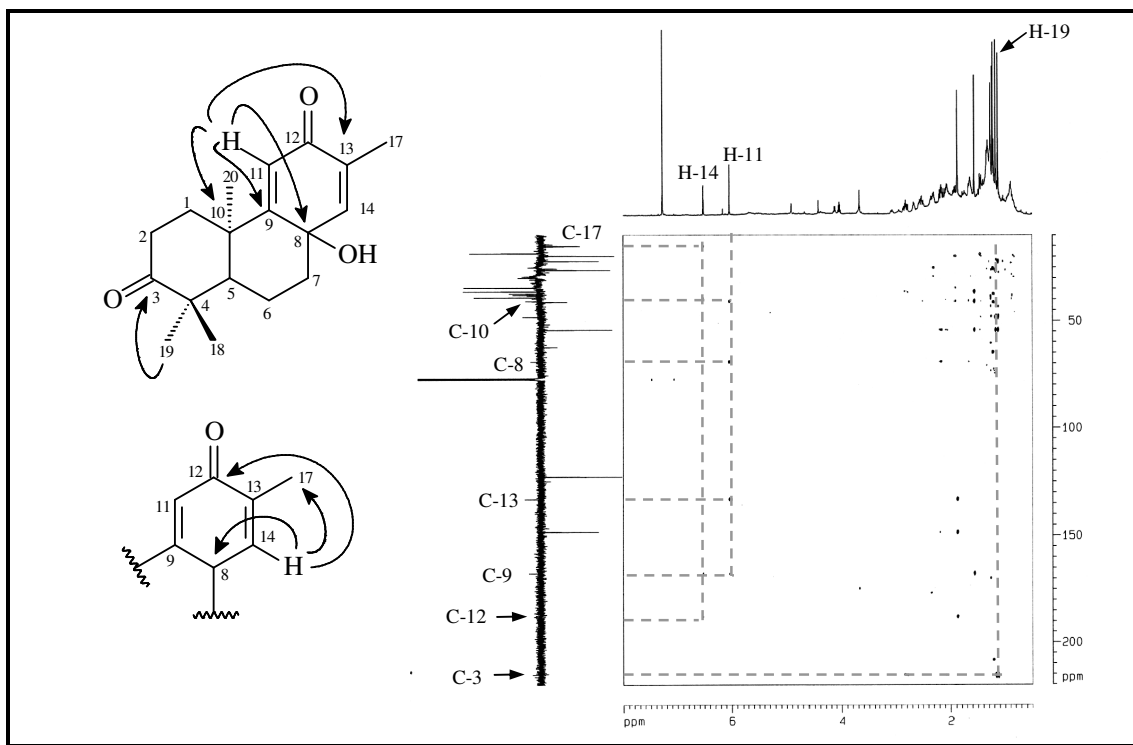


Figura 52 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

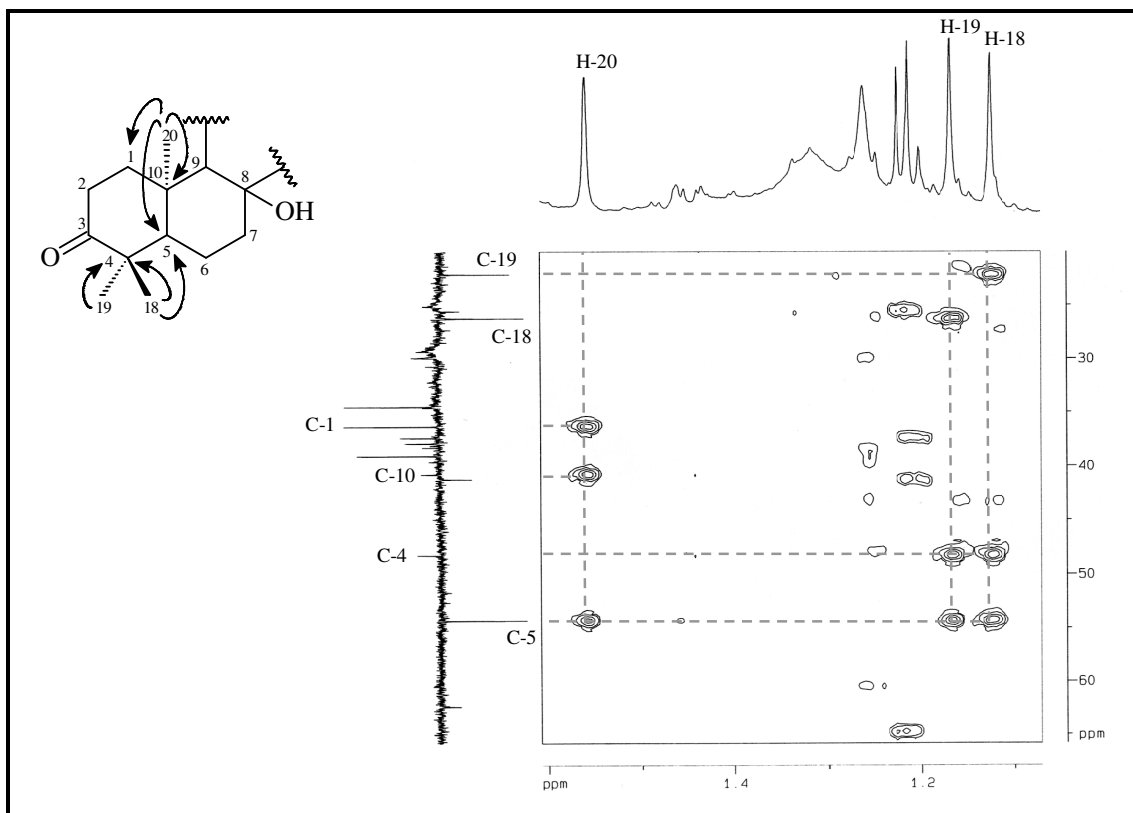


Figura 53 – Espectro HMBC–expansão [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

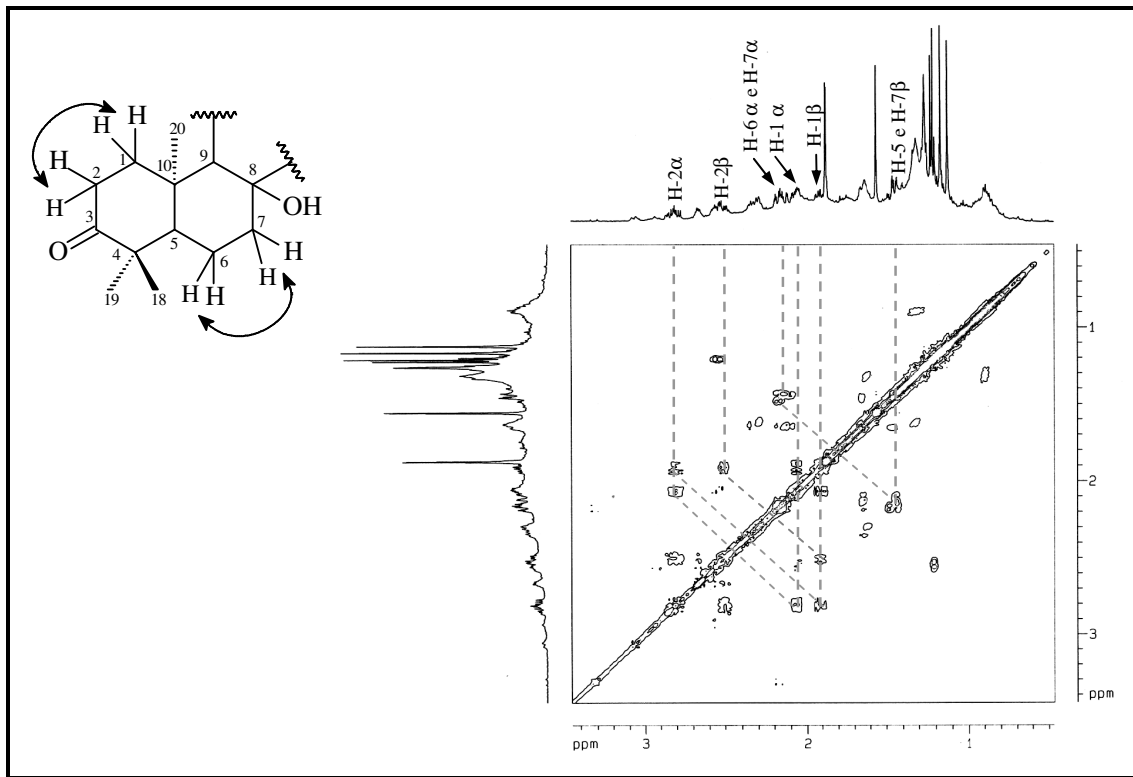


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

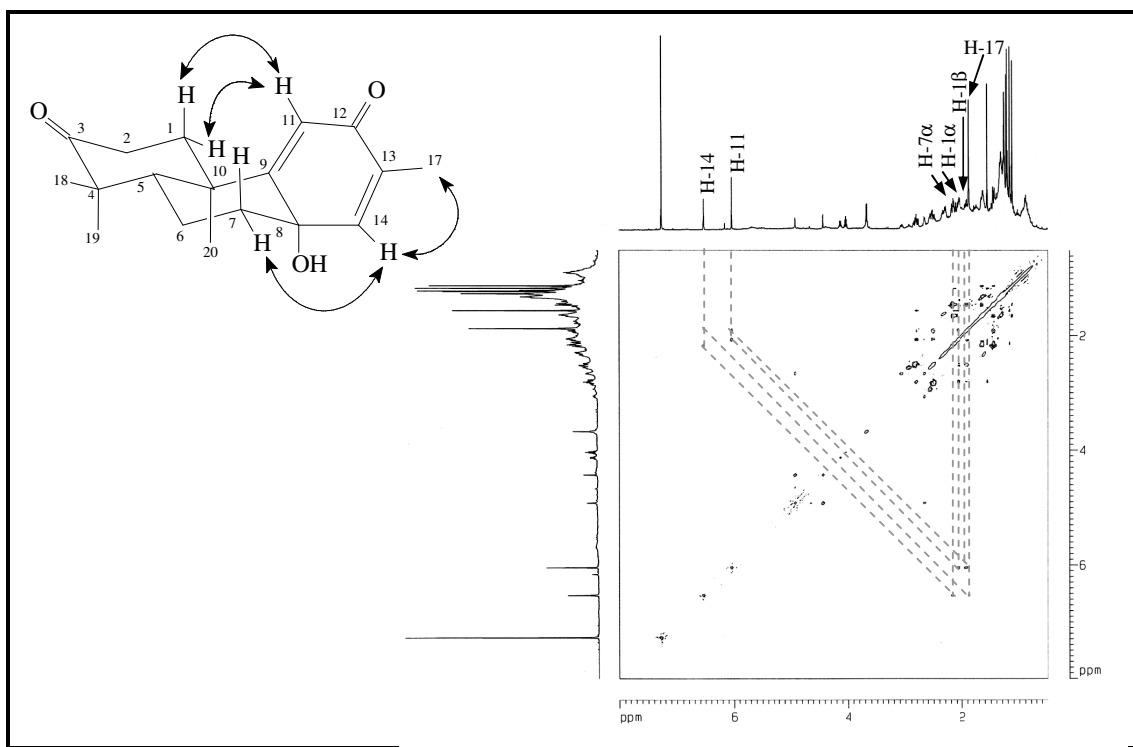


Figura 55 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

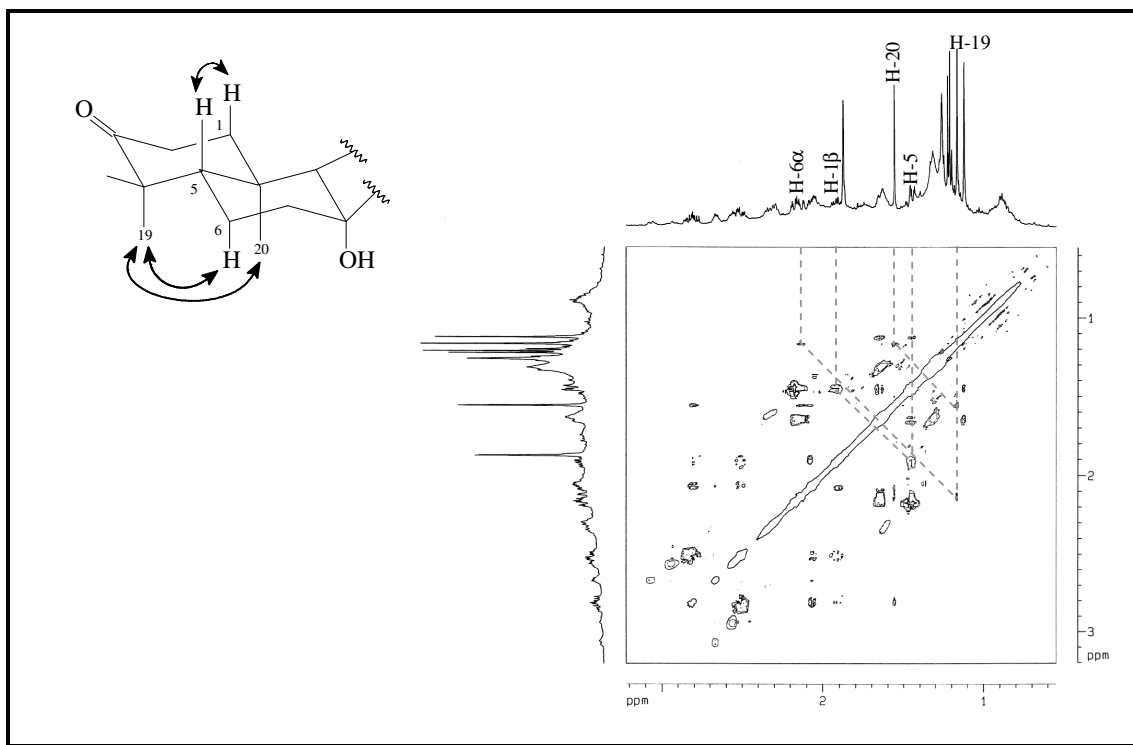


Figura 56 – Espectro de RMN $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – NOESY- expansão [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-4 (132)

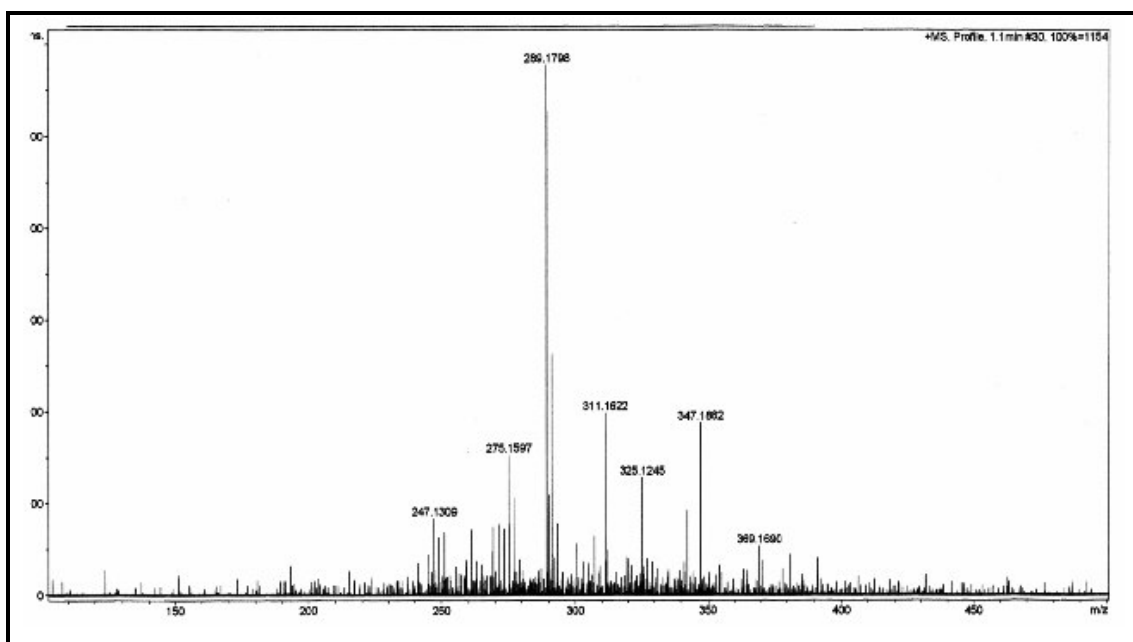


Figura 57 – Espectro de EM-IES de CRTH-4 (132)

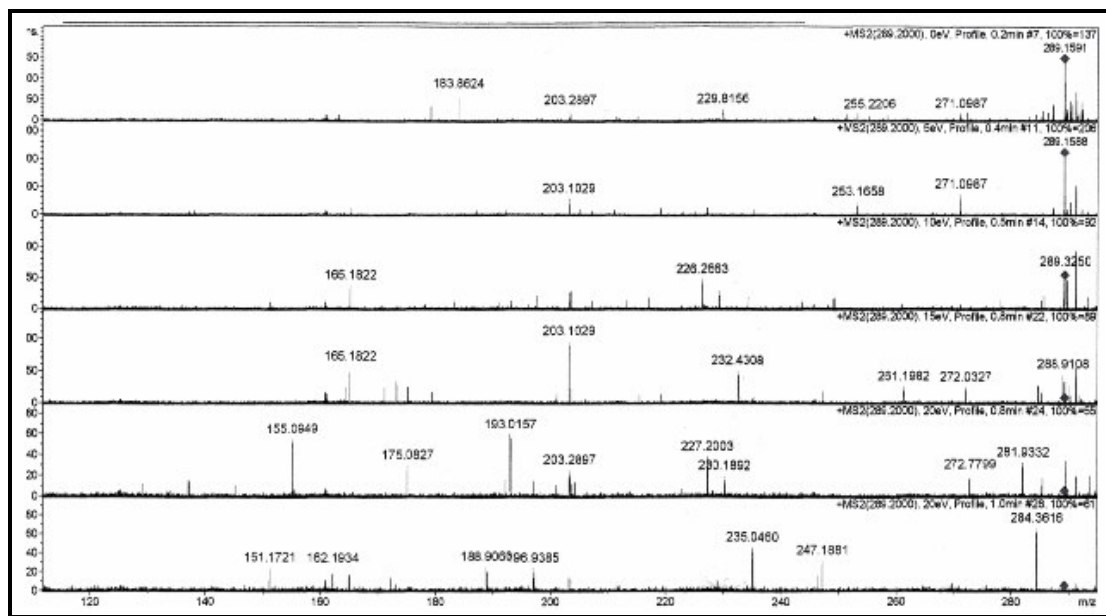


Figura 58 – Espectro de EM/EM-IES de CRTH-4 (132)

3.2.1.5 - Determinação estrutural de CRTE-2 (133)

O tratamento cromatográfico da fração DCM-AcOEt 20% (item 4.4.5.2, pág. 136, Fluxograma 6, pág. 139), possibilitou o isolamento de 12,2 mg de um material cristalino, ponto de fusão na faixa de 90,0 – 91,4 °C, denominado CRTE-2.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 59, pág. 72) apresentou uma banda larga centrada em 3334 cm^{-1} , compatível com vibrações de deformação axial de ligação O-H; bandas em 2918 a 2860 cm^{-1} , características de deformação axial da ligação C-H de grupamentos metílico e metilênico, além das bandas na faixa de 1235 a 1050 cm^{-1} , associadas às deformações axiais de ligações C-O.

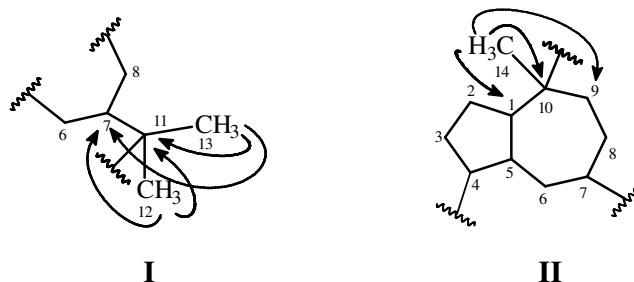
O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, MeOD] (Fig. 60, pág. 72) mostrou quinze linhas espectrais, ressaltando a natureza sesquiterpênica de CRTE-2. A análise comparativa entre os espectros BB e DEPT 135° (Fig. 61, pág. 73) revelou a presença de cinco carbonos metínicos, incluindo um oxigenado (δ_{H} 74,8), cinco carbonos metilênicos, um deles oxigenado (δ_{H} 67,8), três carbonos metílicos e dois carbonos não-hidrogenados, ambos ligados a átomos de oxigênio (δ_{H} 75,8 e 72,9), conforme mostra a Tabela 17, representada abaixo.

Tabela 17 – Padrão de hidrogenação determinado através da análise dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRTE-2

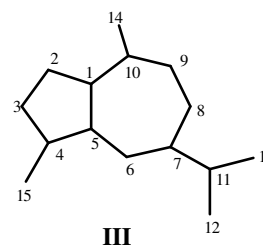
C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
75,6	74,8	67,8	32,0	
72,9	54,7	42,1	28,7	
	43,7	34,1	27,6	
	43,5	27,3		
	42,7	26,3		
2C	5CH	5CH₂	3CH₃	C₁₅H₂₆O₃ ou C₁₅H₂₈O₄
O número de átomos de oxigênio foi deduzido com base no deslocamento de cada átomo de carbono				

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, MeOD] (Fig. 62, pág. 73) exibiu sinais correspondentes a três grupamentos metílicos, todos ligados a carbonos oxigenados [δ_{H} 1,38 (s, 3H-12); 1,27 (s, 3H-13) e 1,13 (s, 3H-14)]. De acordo com o espectro HMBC (Fig. 63, pág. 74) os sinais em δ_{H} 1,38 e 1,27 apresentaram correlações com os sinais de carbono em δ_{C} 47,8 (C-7, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) e 77,6 (C-11, $^2\text{J}_{\text{CH}}$) revelando contigüidade destes grupos (sub-

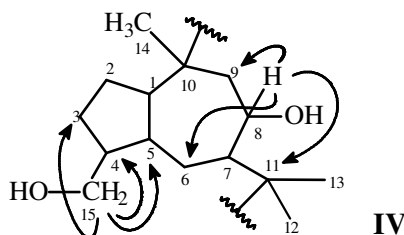
estrutura **I**), enquanto o sinal de hidrogênio em δ_H 1,27 exibiu correlação com os sinais de carbono em δ_C 75,0 (C-10, $^3J_{CH}$) e 55,6 (C-1, $^2J_{CH}$) e 46,0 (C-9, $^3J_{CH}$) (sub-estrutura **II**).



Na região de desproteção do espectro observou-se dois duplos dubletos em δ_H 3,58 ($J=10,6$ e $4,9$ Hz) e 3,42 ($J=10,6$ e $6,8$ Hz), os quais mostraram correlações com os carbonos em δ_C 66,7 (C-15) no espectro HSQC (Fig. 64, pág. 74), sugerindo a existência de um par de hidrogênios diastereotópicos de um grupamento oximetilênico na estrutura de CRTE-2, bem como um sinal em δ_H 4,15 (t, $J=8,8$ Hz) referente a um hidrogênio oximetínico, o qual mostrou acoplamento vicinal com os sinais de hidrogênios em δ_H 2,15/1,95 (dd, 2H-9) e 1,66 (dl, H-7) no espectro COSY (Fig. 65 pág. 75). Adicionalmente o espectro exibiu uma série de sinais correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos metínicos e metilênicos. Estas informações nos possibilitaram deduzir que CRTE-2 tratava-se de um sesquiterpeno de esqueleto guaiano (estrutura **III**).

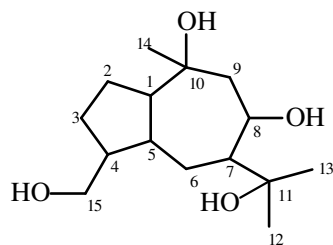
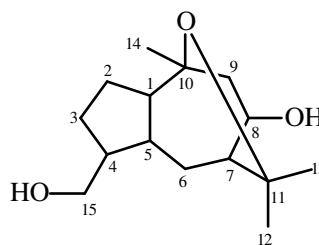


Através da análise do espectro HMBC foi possível determinar com segurança a posição dos substituintes no núcleo guaiano. Uma hidroxila foi posicionada no carbono C-8, em função das correlações observadas entre o sinal do hidrogênio em δ_H 4,15 (2H-8) com os sinais de carbono metilênico em δ_C 46,0 (C-9, $^2J_{CH}$) e 35,8 (C-6, $^3J_{CH}$) e ainda com o carbono não-hidrogenado e oxigenado em 55,6 δ_C (C-11, $^3J_{CH}$). O grupamento oximetilênico foi localizado no carbono C-4, com base nas correlações observadas entre os hidrogênios em δ_H 2,15/1,95 (2H-15) e os sinais de carbono em δ_C 27,4 (C-3, $^3J_{CH}$), 43,7 (C-4, $^2J_{CH}$) e 48,3 (C-5, $^3J_{CH}$), conforme ilustrado na sub-estrutura **IV**.



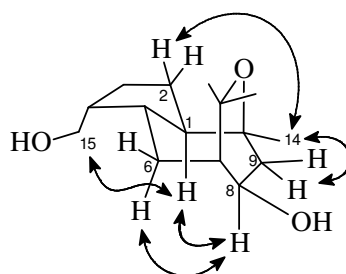
O espectro HSQC permitiu associar seguramente todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos carbonos, conforme mostra Tabela 18 (pág.71).

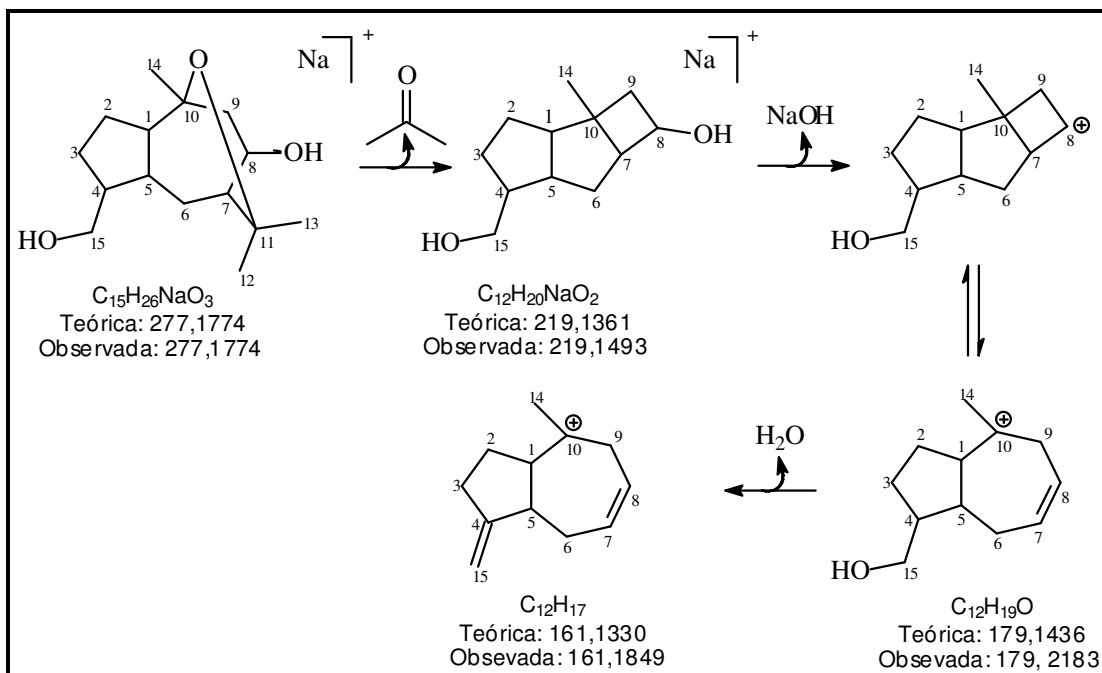
A análise dos dados de RMN ^1H , ^{13}C de CRTE-2, juntamente com os dados do derivado acetilado (CRTE-2Ac), o qual revelou a presença de duas hidroxilas acetiláveis, permitiram propor para CRTE-2 as possibilidades estruturais **V** e **VI**.

**V****VI**

O espectro de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EM-IES) (Fig. 67, pág. 76), foi de extrema importância para determinação da massa molar exata de CRTE-2. Este experimento forneceu o pico correspondente a molécula cationizada, formando o aduto com o sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, em m/z 277,1784 Daltons, descartando a possibilidade **V**. Desta forma, CRTE-2 trata-se da estrutura **VI**, a qual apresenta-se na forma epoxidada. Esta estrutura foi corroborada através dos fragmentos em m/z 291,1493; 179,2183 e 161,1849 associados à perda de uma molécula de propanona, um grupo hidroxila e uma moléculas de água, respectivamente, exibidos pelo espectro EM/EM-IES (Fig. 68, pág. 76), conforme mostra o quadro 4 (pág. 70).

A configuração relativa inferida para os centros estereogênicos existentes na molécula foi deduzida através do espectro NOESY (Fig. 66, pág. 75), o qual revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ_{H} 4,15 (H-8) e os hidrogênios em δ_{H} 1,33 (H α -6) e 1,70 (H-1) e deste último com os hidrogênios em δ_{H} 3,58/3,42 (2H-15), como também dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,13 (3H-14) com os hidrogênios em δ_{H} 1,54/1,37 (2H-2) e 2,15/1,15 (2H-9) (Estrutura **VII**).

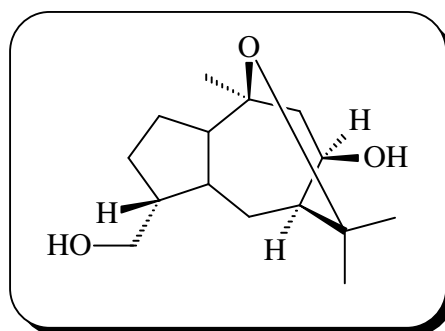
**VII**



Quadro 4- Fragmentos observados no espectro EM/EM-IES do íon $[M+Na]^+$, que justificam a presença do epóxido e duas hidroxilas na estrutura de CRTE-2.

A reunião de todos os dados analisados permitiu afirmar indubitavelmente que CRTE-2 tratava-se de um sesquiterpeno de esqueleto guaiano, cuja nomenclatura sistemática é 1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno (**133**). Um minucioso levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez na literatura.

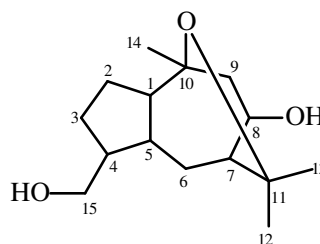
Vale ressaltar que o potencial citotóxico deste metabólito secundário foi avaliado empregando as linhagens de células tumorais humanas leucemia (HL60), cólon (HCT8), mama (MDA-MB-435) e cérebro (SF295), sendo que para todas as linhagens o composto testado mostrou-se inativo.



(133)

Tabela 18 – Deslocamentos químicos de (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOH) de CRTE-2

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$ e $^4\text{J}_{\text{CH}}$
1	55,6	1,7 (m)		2H-3; H-6a; H-9b; 3H-14
2	28,3	1,54 (m); 1,37 (m)	2H-3	
3	27,4	2,28 (m); 1,33 (m)		2H-15
4	43,7	1,71 (m)	H-5; 2H-15	H-1; H-2a; 2H-6
5	48,3	1,63 (m)	2H-6	H-2a; H-7; 2H-15
6	35,8	2,28 (m); 1,33 (m)	H-7	H-8
7	47,8	1,66 (dl, 5,9)	H-6a	H-9a; 3H-12; 3H-13
8	72,8	4,15 (t, 8,8)	H-7; 2H-9	2H-6
9	46,0	2,15(dd, 13,7; 9,4) 1,95 (dd, 13,7; 8,8)	H-8	H-7; 3H-14
10	75,0	-	3H-14	
11	77,6	-	3H-12; 3H-13	H-8
12	32,6	1,38 (s)		H-7; 3H-13
13	29,3	1,27 (s)		3H-12
14	27,9	1,13 (s)		H-3b; 2H-9
15	66,9	3,58 (dd, 10,6; 4,9) 3,42 (dd, 10,6; 6,8)		H-5; 2H-3

^a 125 MHz; ^b 500 MHz

CRTE-2

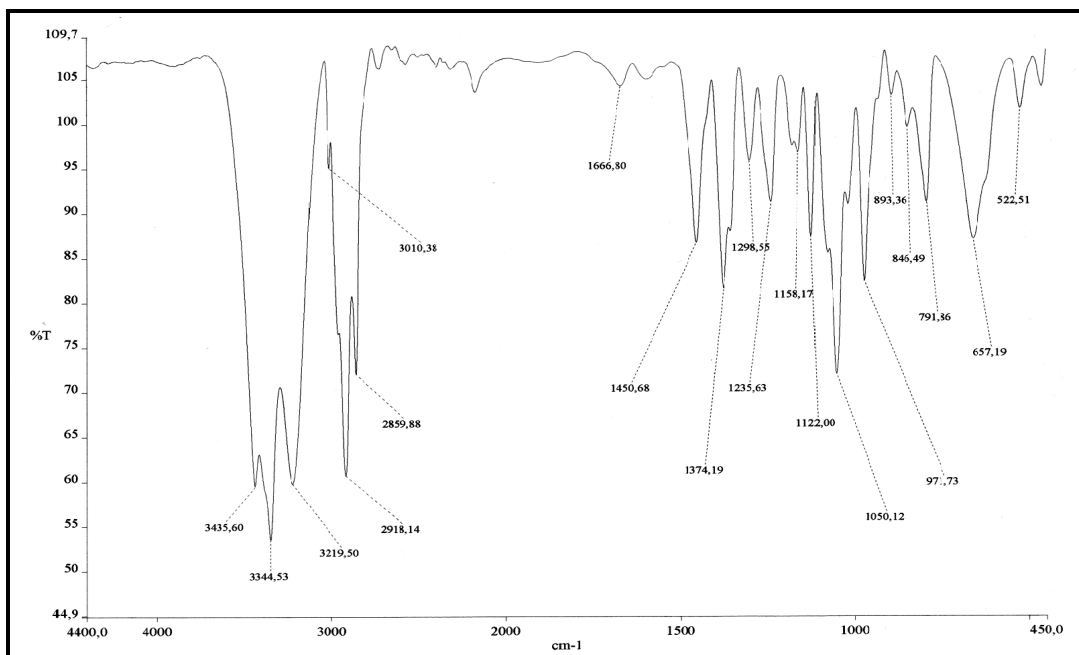


Figura 59 – Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm⁻¹) de CRTE-2 (133)

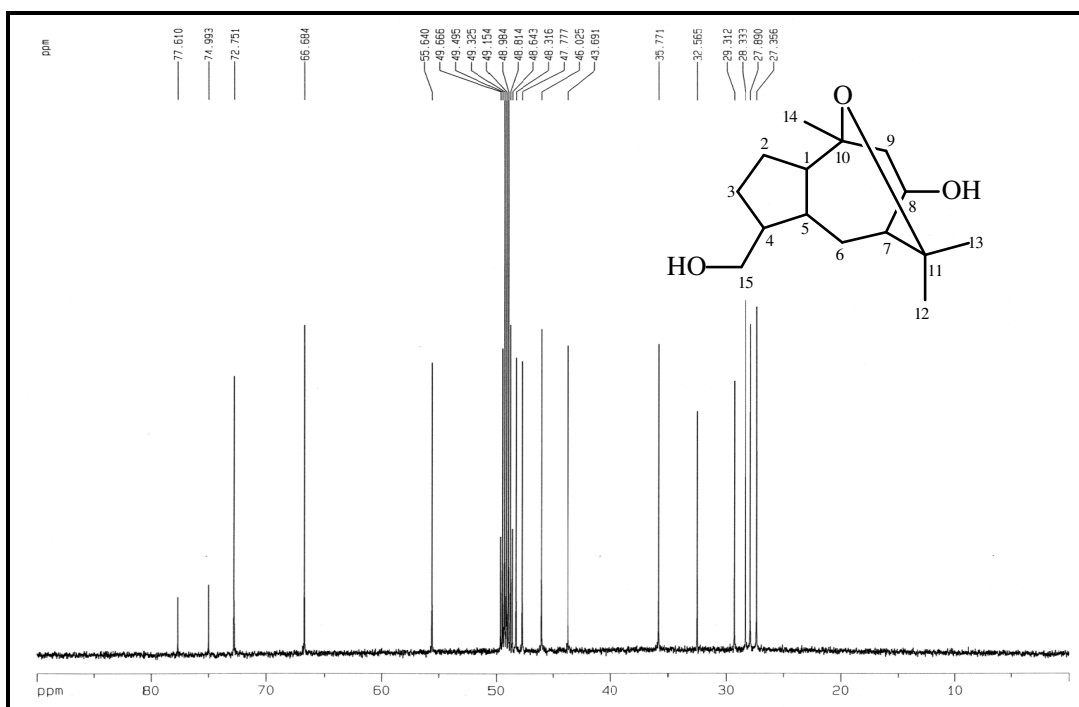


Figura 60 – Espectro de RMN ¹³C-BB [125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

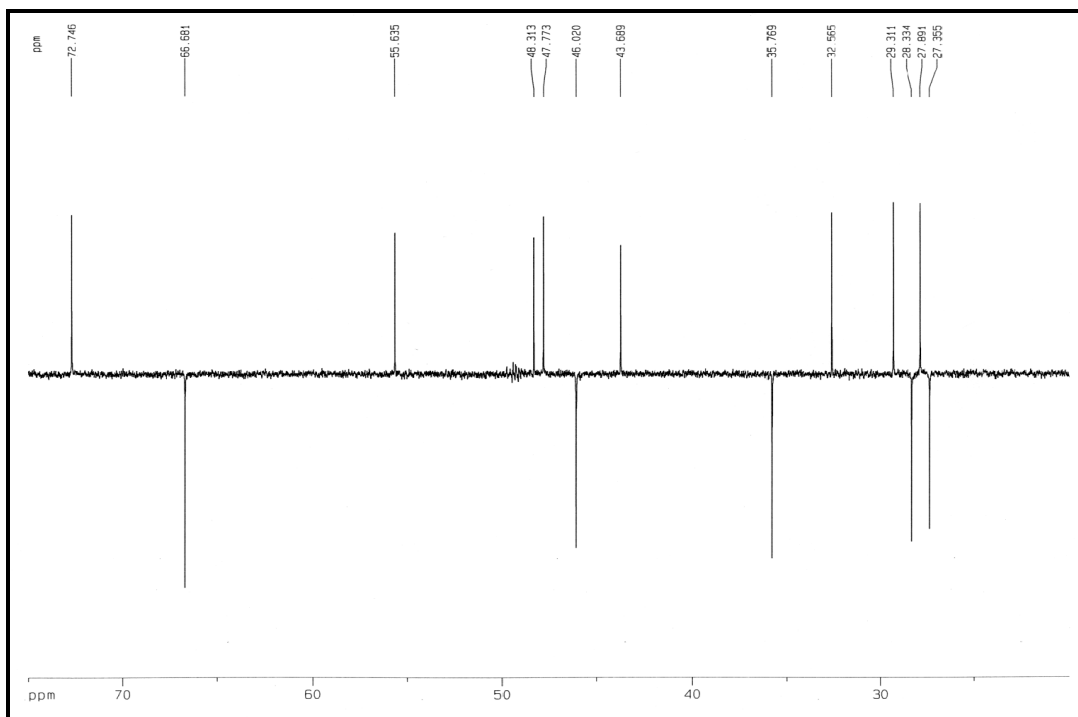


Figura 61 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

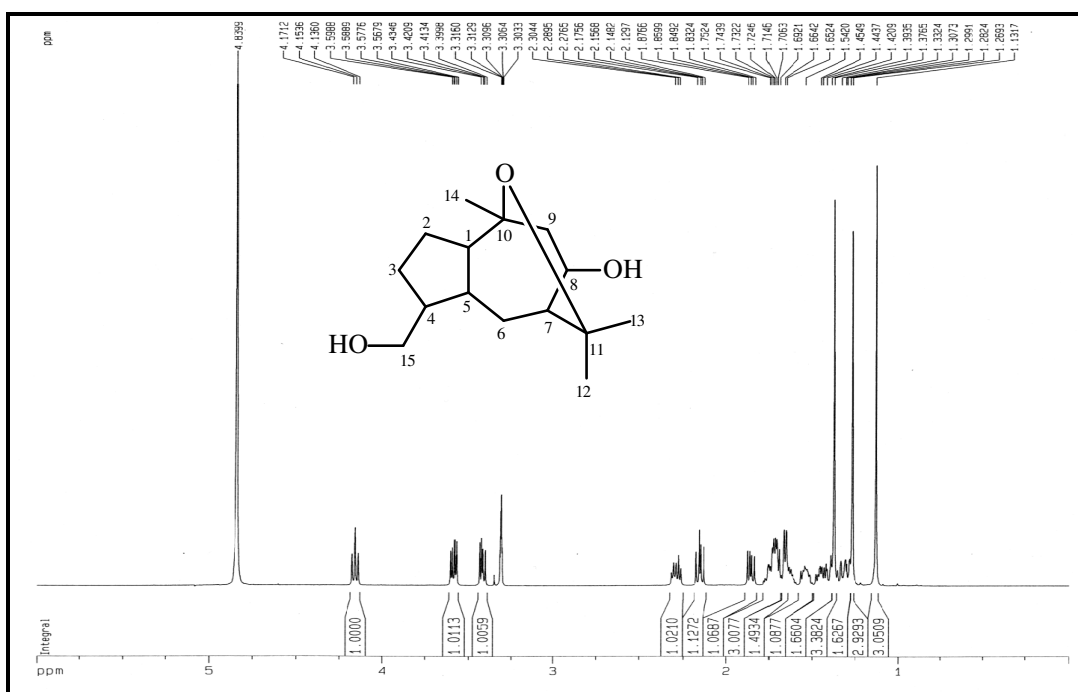


Figura 62 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

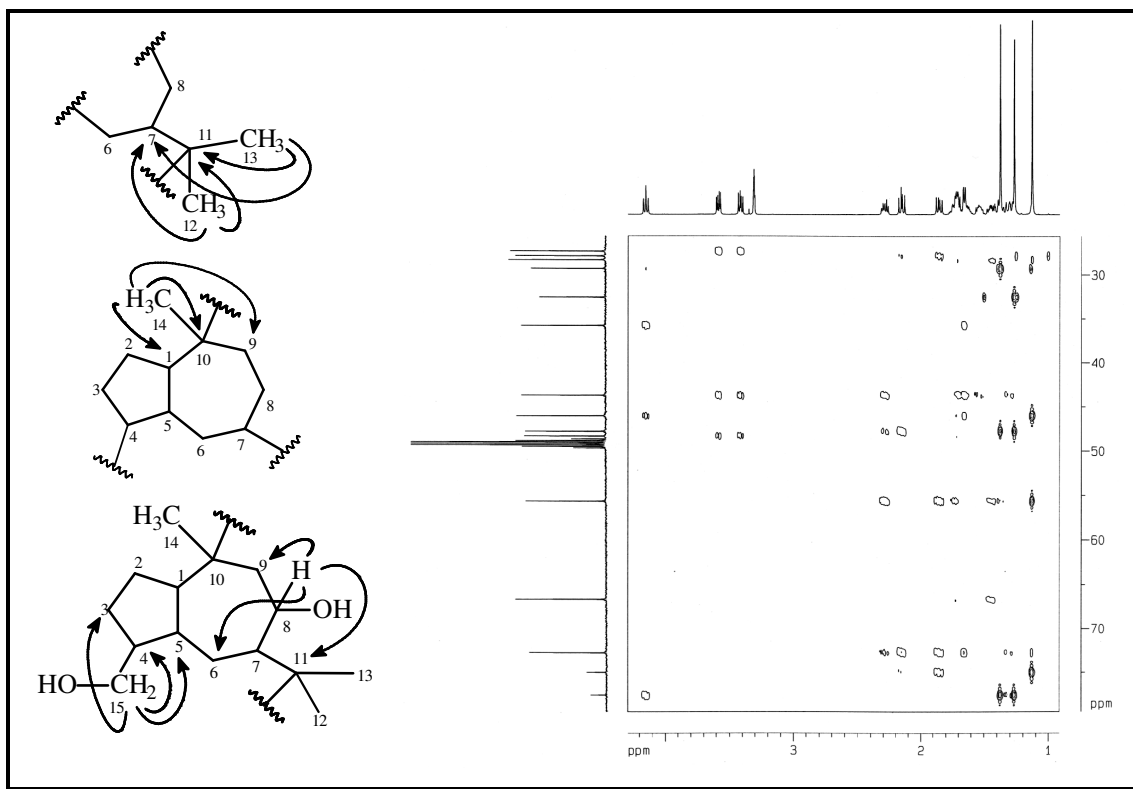


Figura 63 – Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

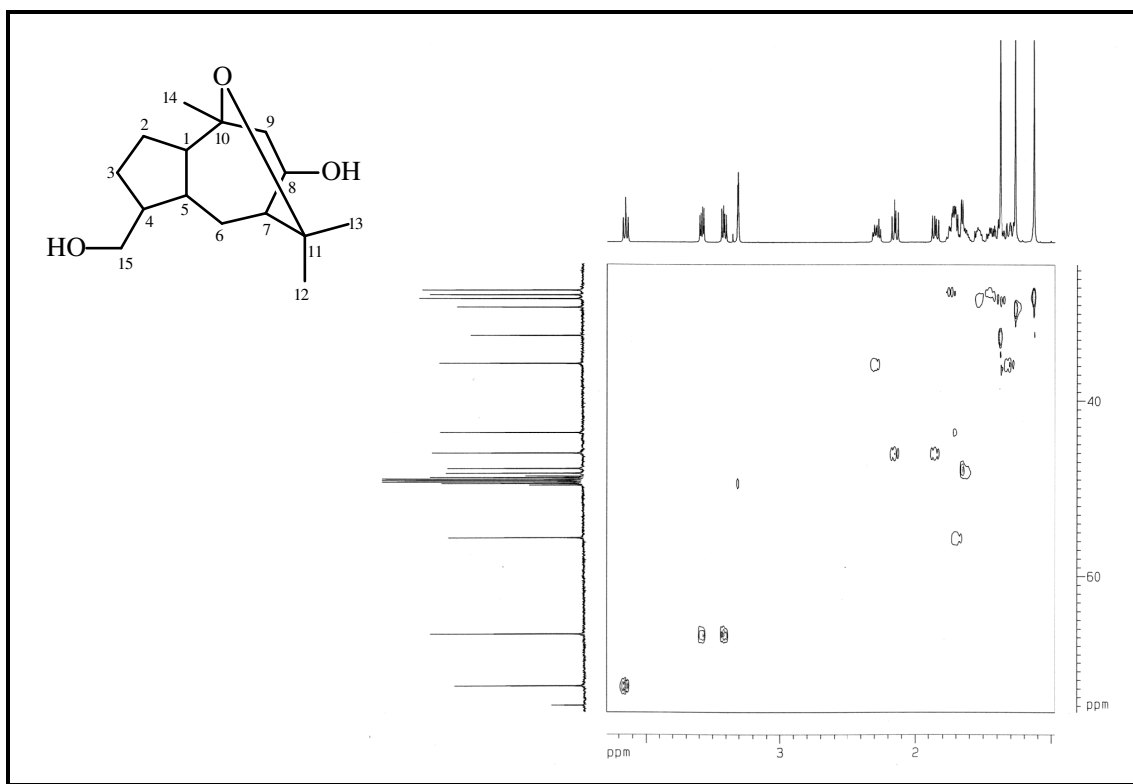


Figura 64 – Espectro HSQC-[500 e 125 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

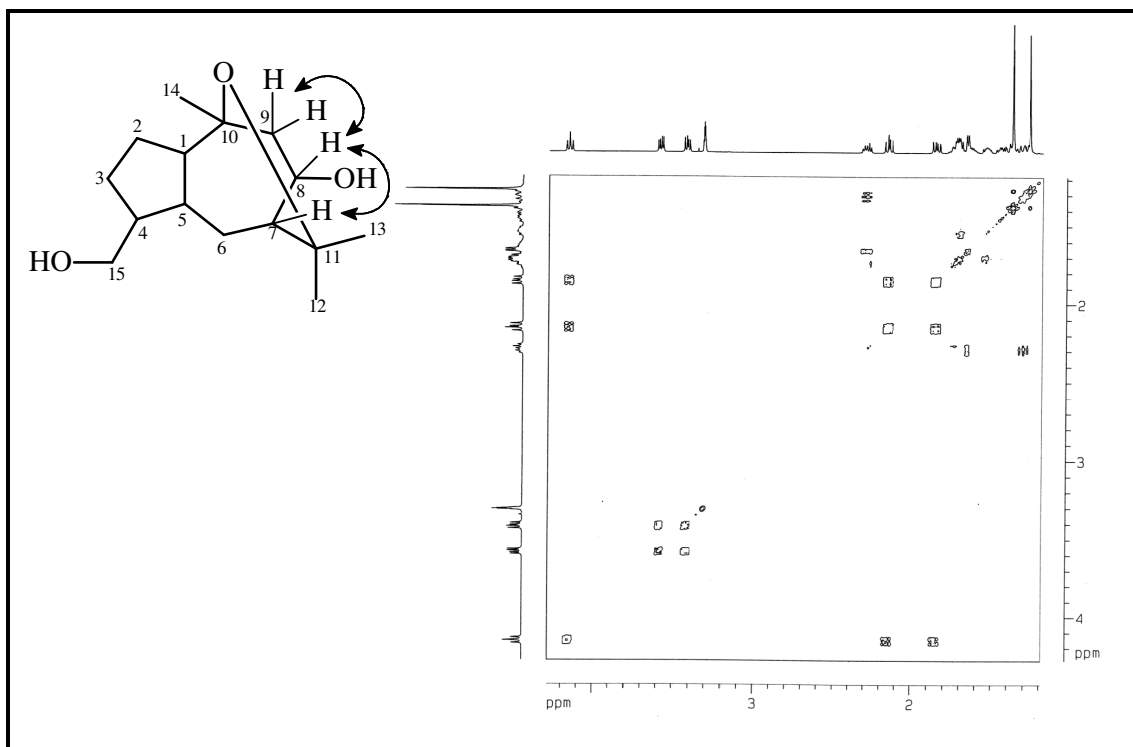


Figura 65 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY- [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

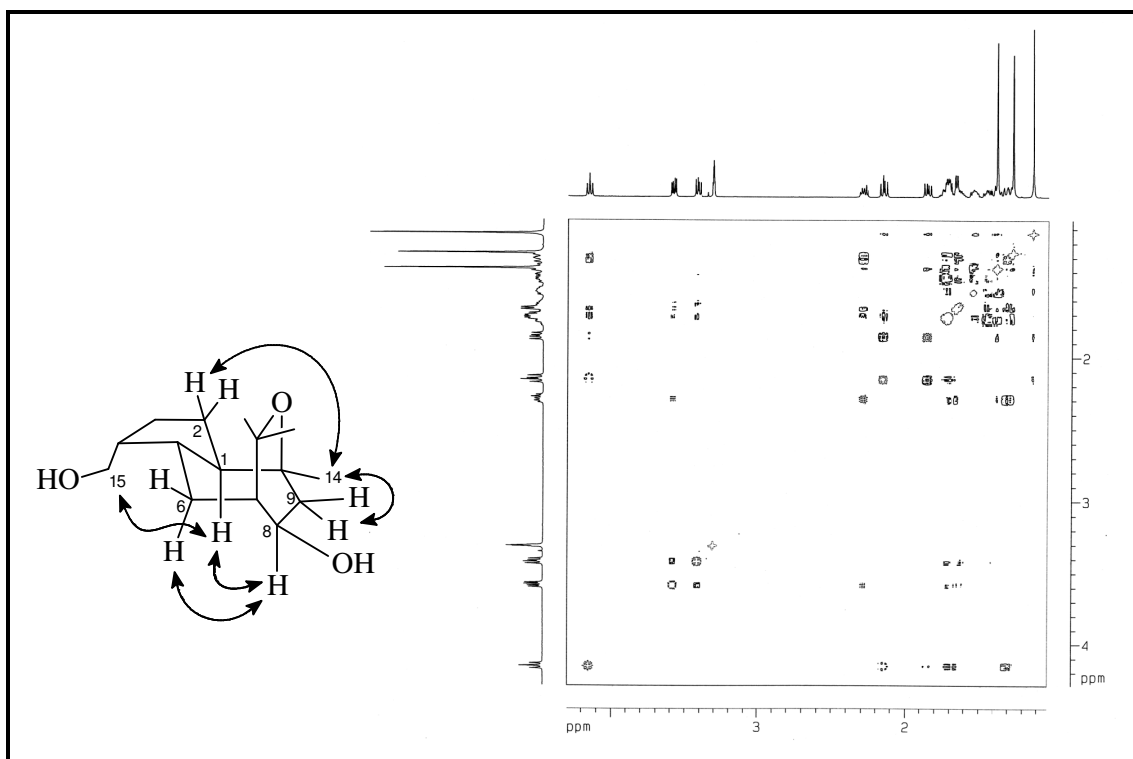


Figura 66 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY- [500 MHz, MeOD] de CRTE-2 (133)

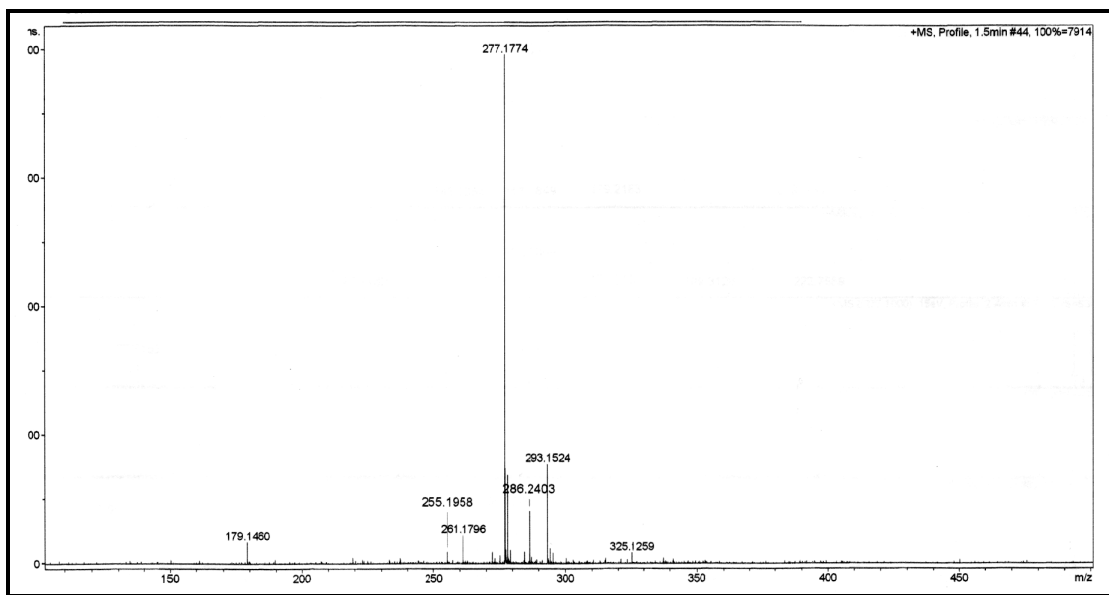


Figura 67 – Espectro de EM-IES de alta resolução de CRTE-2 (133)

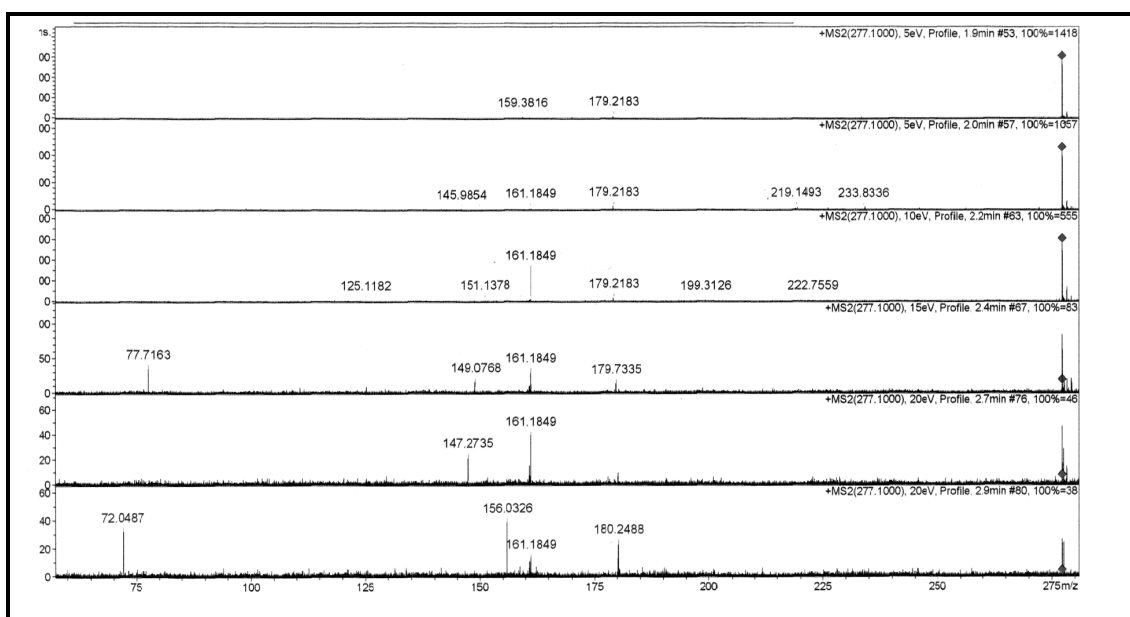


Figura 68 – Espectro de EM/EM-IES de CRTE-2 (133)

3.2.1.6 - Reação de Acetilação – CRTE-2Ac (**134**)

CRTE-2 foi submetido à reação de acetilação utilizando piridina e anidrido acético (item 4.5.1 pág. 144) obtendo-se um sólido branco amorfo, codificado por CRTE-2Ac.

O espectro de absorção na região do infravermelho de CRTE-2Ac (Fig. 69 pág. 79), quando comparado com o de CRTE-2, não apresentou a banda larga centrada em 3344 cm^{-1} , referentes às vibrações de deformação axial da ligação O-H, entretanto revelou uma banda adicional em 1738 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação C=O de éster.

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 68 pág. 79) mostrou sinais em δ_{H} 2,05 e 2,04 referentes aos hidrogênios metílicos de grupamentos acetilas.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CRTE-2Ac (Figs. 71 e 72, pág 80) com os de CRTE-2 (Tabela 19, pág. 78), mostrou a presença dos sinais adicionais em δ_{C} 171,5; 170,8; 21,6 e 21,2 referentes aos carbonos pertencentes a dois grupos acetila.

A análise dos dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C confirmou a presença de duas hidroxilas acetiláveis, uma ligada ao carbono C-8 e a outra ao carbono C-15, em função dos valores de deslocamentos químicos de ambos os carbonos terem sido deslocados para região de menor proteção, devido ao efeito β ocasionado pelo grupo acetila. Também foi observado mudanças nos carbonos adjacentes aos carbonos oxigenados devido o efeito protetor (efeito γ) provocado pelos grupos acetilas (Tabela 19, pág.78).

A reação de acetilação de CRTE-2 além de confirmar a proposta estrutural para a referida substância, produziu o composto denominado de acetato de 1α -hidroximetil- 6β -hidroxi- 4α -metil- 7β -(1-metiletil)- 4β , 11β -epoxi-decahidroazuleno (**134**), também descrito na literatura pela primeira vez.

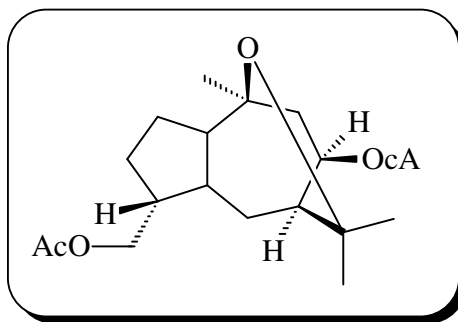
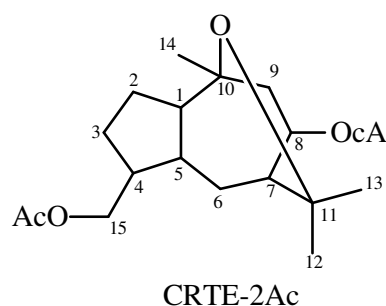
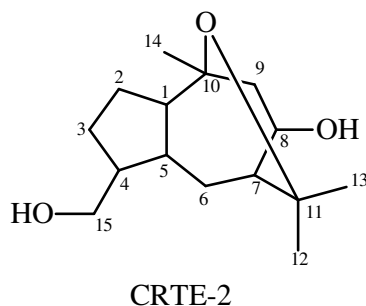
**(134)**

Tabela 19 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de CRTE-2 e do seu derivado CRTE-2Ac (CDCl_3)

C	CRTE-2Ac		CRTE-2	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1	54,6	1,71 (m)	55,6	1,7 (m)
2	27,3	1,55 (m); 1,41 (m)	28,3	1,54 (m); 1,37 (m)
3	26,31	1,77(m); 1,41 (m)	27,4	2,28 (m); 1,33 (m)
4	42,7	1,73 (m)	43,7	1,71 (m)
5	43,5	1,83	48,3	1,63 (m)
6	34,1	2,28 (dt, 14,1; 6,7; 1,47)	35,8	2,28 (m); 1,33 (m)
7	47,8	1,73	47,8	1,66 (dl, 5,9)
8	74,8	5,08 (t, 8,9)	72,8	4,15 (t, 8,8)
9	42,1	2,18 (dd, 13,8; 9,7) 1,94 (dd, 13,8; 8,4)	46,0	2,15(dd, 13,7; 9,4) 1,95 (dd, 13,7; 8,8)
10	72,9	-	75,0	-
11	75,4	-	77,6	-
12	32,0	1,34 (s)	32,6	1,38 (s)
13	28,7	1,25 (s)	29,3	1,27 (s)
14	27,7	1,16 (s)	27,9	1,13 (s)
15	67,8	4,04 (d, 4,1)	66,9	3,58 (dd, 10,6; 4,9) 3,42 (dd, 10,6; 6,8)
	$\text{CH}_3\text{CO-8}$	170,8 -		
	$\text{CH}_3\text{CO-15}$	170,2 -		
	$\underline{\text{CH}}_3\text{CO-8}$	21,7 2,05 (s)		
	$\underline{\text{CH}}_3\text{CO-15}$	21,2 2,04 (s)		

^a125 MHz; ^b500 MHz;

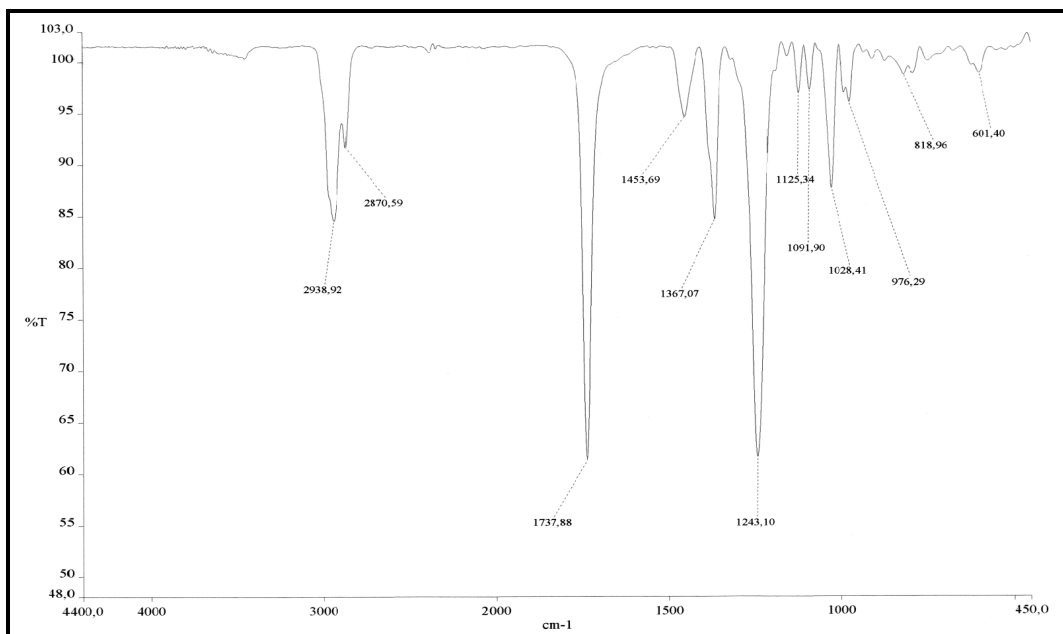


Figura 69 – Espectro de absorção na região do IV (NaCl, cm^{-1}) de CRTE-2Ac (**134**)

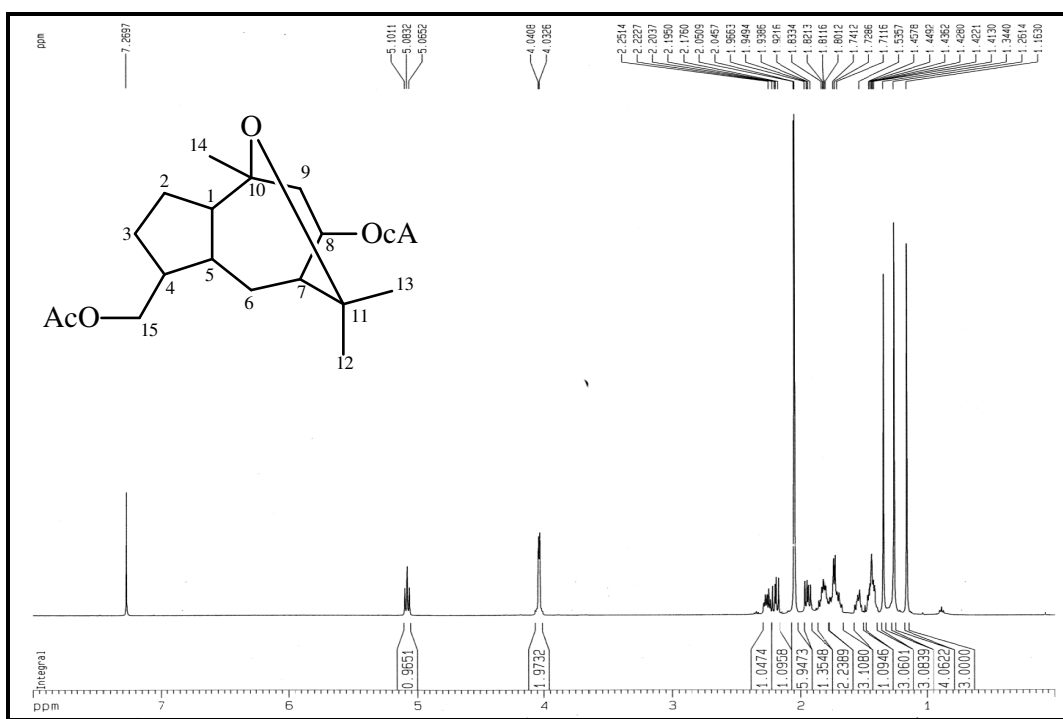


Figura 70 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CCl_3D] de CRTE-2Ac (**134**)

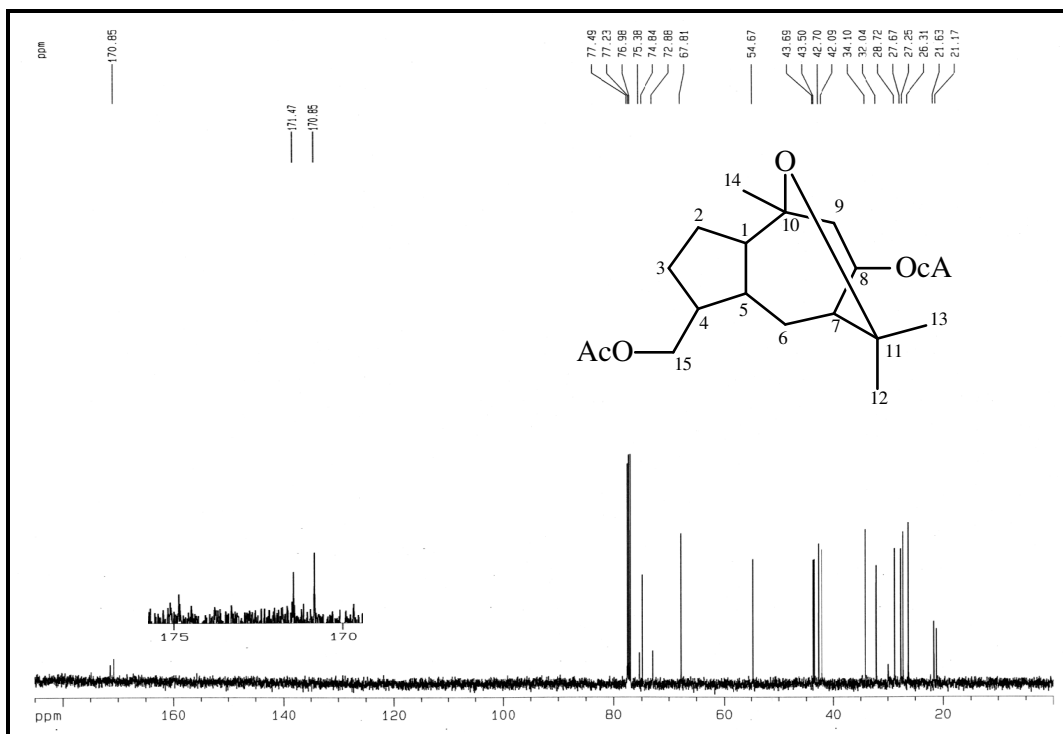


Figura 71 – Espectro de RMN ^{13}C [125 MHz, CDCl_3] de CRTE-2Ac (134)

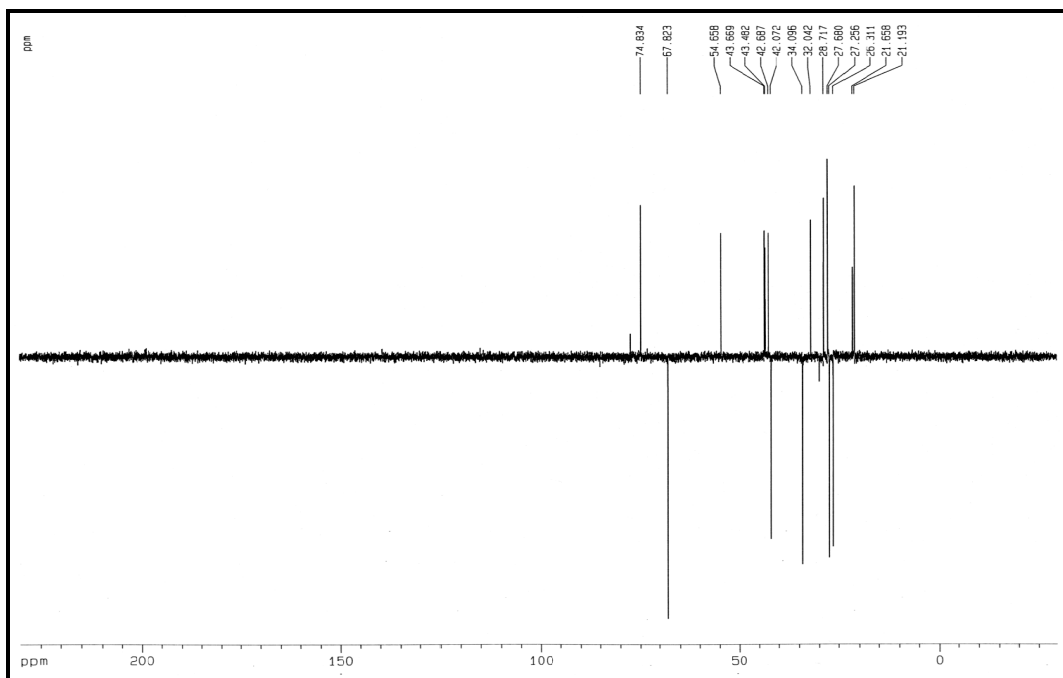


Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CRTE-2Ac (134)

3.2.2 – Determinação estrutural dos esteróides

3.2.2.1 – Determinação estrutural de CRTH-3 (135 e 136)

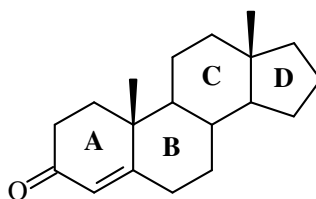
A fração AcOEt do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus* (item 4.4.5.1, pág. 135) após sucessivos tratamentos cromatográficos, incluindo CLAE, forneceu 6,9 mg de um material resina incolor, codificado de CRTH-3.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 73 pág. 87) revelou uma banda larga em 3446 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação O-H de hidroxila; bandas em 2933 e 2860 cm^{-1} de deformação axial da ligação C-H de grupamentos metílico e metilênico e uma banda em 1714 cm^{-1} , associada à deformação axial de ligação dupla C=O.

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Figs. 74 e 75, págs. 87 e 88) mostrou sinais de hidrogênios para seis grupos metilas em δ_{H} 0,75 (s, 3H-18); 1,38 (s, 3H-19); 0,94 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H-21); 0,85 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H-26); 0,83 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H-27) e 0,86 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H-29), um hidrogênio olefínico aparecendo como um singleto em δ_{H} 5,83 (H-4) e um sinal na região de hidrogênio ligado a carbono carbinólico em δ_{H} 4,36 (t, $J=2,5$ Hz, H-6). Além de um número significativo de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , revelando a natureza esteroidal do composto isolado.

O espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 76, pág. 88) permitiu identificar quatro carbonos não-hidrogenados com sinais em δ_{C} 168,7; 38,2; 42,7 e 200,6. Sendo o último referente a uma carbonila de cetona α , β - insaturada e o primeiro, atribuído ao carbono β da ligação dupla, conjugada à carbonila. Além destes, foi verificado a presença de nove carbonos metínicos, dez carbonos metilênicos e seis carbonos metílicos, sendo estes dados, portanto, compatíveis com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ (Tabela 20, pág. 82).

Como a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ apresenta 6 lacunas de insaturação, justificou-se duas das seis, através da carbonila e uma ligação dupla. Conseqüentemente, as demais insaturações foram atribuídas a quatro ciclos. Estes dados levou-nos a concluir que CRTH-3 tratava-se de um esteróide tetracíclico, contendo uma carbonila α , β - insaturada provavelmente no anel A, como mostra a estrutura **I**.



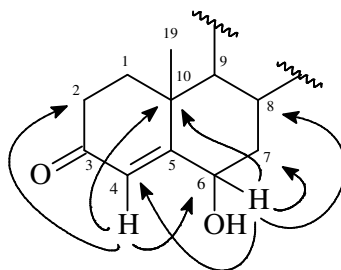
I

Tabela 20 – Padrão de hidrogenação determinado através da análise do espectro de RMN ^{13}C -APT de CRTH-3

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
200,6	126,6	37,3	12,2	
168,6	73,5	34,5	19,7	
38,2	29,9	38,8	18,9	
42,7	53,9	21,2	20,0	
	56,3	39,8	19,3	
	56,1	24,4	12,2	
	36,3	28,4		
	46,1	34,1		
	29,4	26,3		
		23,3		
4C	9CH	10CH₂	6CH₃	C₂₉H₄₈O₂

As correlações inequívocas de todos os átomos de carbono e hidrogênio foram determinadas com o auxílio do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (Fig.77, pág. 89).

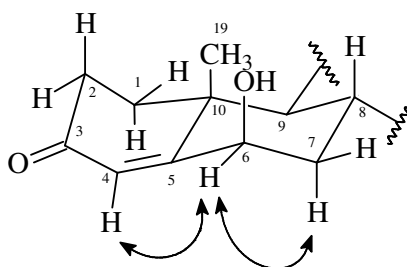
Através da análise do espectro HMBC (Figs. 78 e 79, págs. 89 e 90) foi possível determinar com segurança a localização da dupla ligação entre os carbonos C-4 e C-5, em função da correlação a três ligações ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) do hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,83 (H-4) com os sinais de carbono em δ_{C} 38,2 (C-10), 34,5 (C-2) e 73,5 (C-6). A hidroxila foi posicionada no carbono C-6, apoiada nas correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 4,36 (H-6) com os carbonos em δ_{C} 38,2 (C-10, $^3\text{J}_{\text{CH}}$), 38,8 (C-7, $^3\text{J}_{\text{CH}}$), 29,9 (C-8, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) e 126,6 (C-4, $^2\text{J}_{\text{CH}}$). A subestrutura II as principais correlações a longa distância (^1H , ^{13}C – HMBC) de CRFH-4.



II

O espectro ^1H - ^1H COSY (Fig. 80, pág. 90) confirmou a posição dos grupos funcionais nos anéis A e B, através do acoplamento vicinal entre o hidrogênio oxigenado em δ_{H} 4,36 (H-6), com os hidrogênios em δ_{H} 2,01 e 1,28 (2H-7), e dos sinais em δ_{H} 2,52 e 2,40 (2H-2) acoplado com os hidrogênios em δ_{H} 2,05 e 1,70 (2H-1), revelando um sistema isolado.

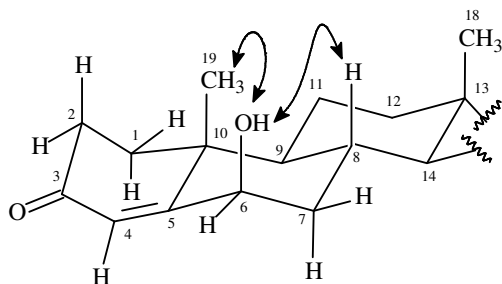
A configuração relativa inferida para o grupo hidroxila ligado ao carbono C-6 foi deduzida através do espectro NOESY (Fig. 81 pág. 91), o qual revelou interações espaciais do hidrogênio em δ_{H} 4,36 (H-6) com os hidrogênios em δ_{H} 5,83 (H-4) e 1,28 (H $_{\alpha}$ -7). Estas interações justificam a configuração β para grupo hidroxila, apoiadas também por comparação com dados de RMN ^1H e ^{13}C do 6 α - e 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (Tabela 16, pág. 57).



Como pode ser observado a partir da Tabela 21 (pág. 86) as principais diferenças que diferenciam os dois isômeros residem nos deslocamentos químicos referentes aos carbonos C-8 e C-10. Os deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos C-8 e C-10 no 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, são mais protegidos que no 6 α -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, devido ao efeito protetor provocado pela hidroxila axial em C-6 que apresenta uma disposição γ gauche em relação aos referidos carbonos.

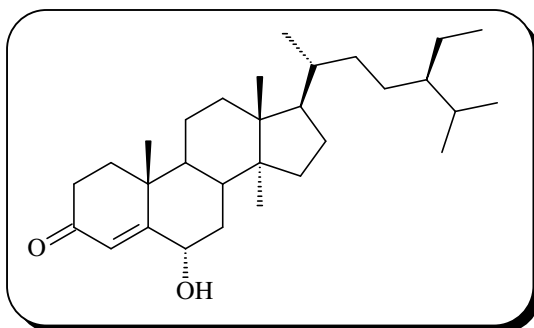
Quanto aos dados de RMN ^1H , a principal diferença ocorre no deslocamento químico do sinal de hidrogênio correspondente a metila-19, onde a interação 1,3-diaxial

envolvendo o grupo hidroxila em posição β contribui para desproteger aqueles hidrogênios (CH₃-19).



III

De acordo com os dados descritos e com base na análise comparativa dos dados de RMN ¹³C registrado na literatura (Greca, *et al.*, 1990), chegou-se à conclusão de que CRTH-3 tratava-se do esteróide tetracíclico 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, já relatado na família Euphorbiaceae (Hui, 1975). Vale ressaltar que esta substância foi isolada de uma fração que apresentou significativa atividade citotóxica e por este motivo foi submetida à avaliação do potencial citotóxico, porém não apresentou resultado positivo em relação ao teste.

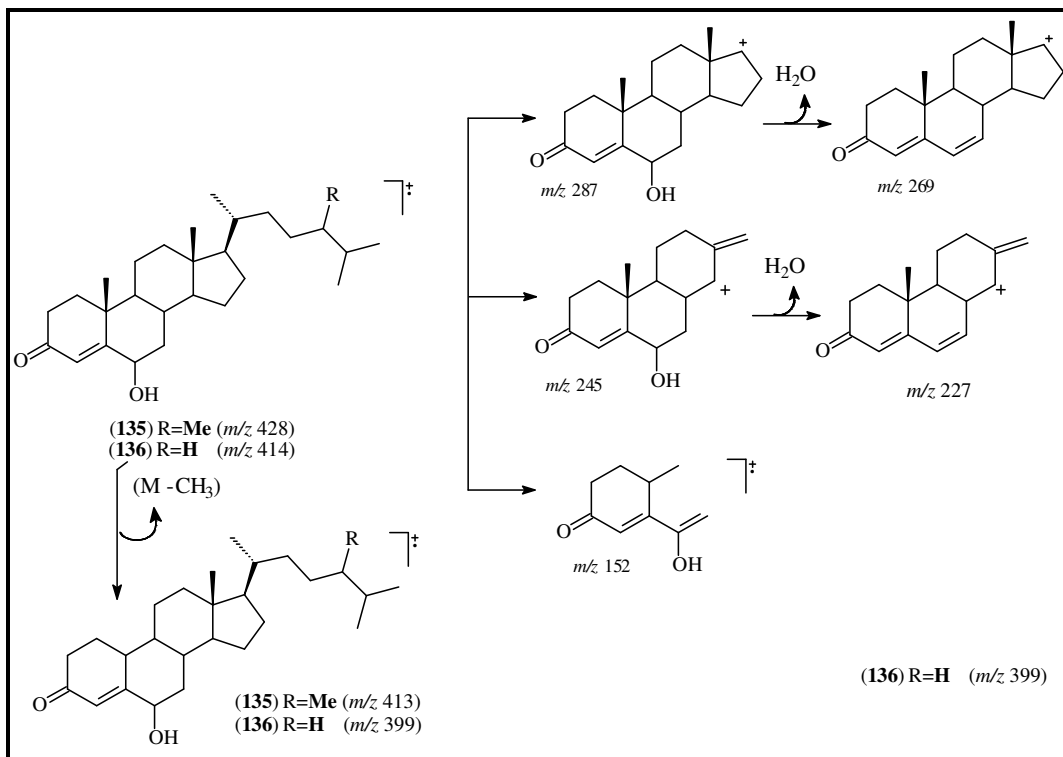


6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (135)

Uma meticulosa análise dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C-APT, revelou que CRTH-3 tratava-se de uma mistura binária dos esteróides 6 β -hidroxi-campest-4-en-3-ona (C₂₈H₄₆O₂) e 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (C₂₉H₄₈O₂).

O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 82, pág. 91), corroborou que CRTH-3 constituía uma mistura dos esteróides β -hidroxi-campest-4-en-3-ona e 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, quando apresentou os picos em *m/z* 428 e 414 Daltons, respectivamente, correspondentes ao íon molecular [M]⁺ de cada composto, bem como os picos em *m/z* 413 e 399 Daltons compatível com a perda de uma metila (M –

CH₃). Os fragmentos em m/z 287, 247, 269, 227 e 152 Daltons, podem ser obtidos de ambos os isômeros, conforme descrito no Quadro abaixo.



Quadro 5 - Proposta mecânica para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massa de CRTH-3

A reunião de todos os dados analisados permitiu identificar CRTH-3 como sendo a mistura dos esteróides 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (**135**) e 6 β -hidroxi-campest-4-en-3-ona (**136**), já conhecidos na literatura. Porém um minucioso levantamento bibliográfico revelou que estas substâncias estão sendo registradas pela primeira vez no gênero *Croton*.

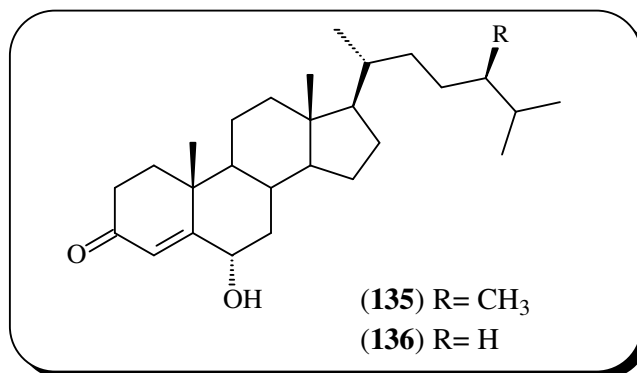


Tabela 21 – Dados de RMN ^{13}C e ^1H de CRTH-3 comparados com valores da literatura (Greca, *et al.*, 1990) usando CDCl_3 como solvente

C	CRTH-1		6 β -OH		6 α -OH	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,3	2,05; 1,7	38,1	-	36,3	-
2	34,5	2,52; 2,4	34,2	-	34,1	-
3	200,6	-	200,1	-	202,9	-
4	126,6	5,83 (s)	126,3	5,82 (s)	119,4	6,2 (d; 1,8)
5	168,7	-	168,5	-	157,8	-
6	73,5	4,36 (t; 2,5)	73,2	4,34 (m)	68,7	4,32 (m)
7	38,8	2,01; 1,28	38,6	-	39,4	-
8	29,9	1,68	29,7	-	33,8	-
9	53,9	0,92	53,6	-	53,7	-
10	38,2	-	38,0	-	39,3	-
11	21,2	1,33	21,0	-	21,0	-
12	39,8	2,07; 1,18	39,6	-	39,4	-
13	42,7	-	42,5	-	41,5	-
14	56,3	1,13	55,9	-	55,5	-
15	24,4	1,62; 1,16	24,1	-	24,1	-
16	28,4	1,87	28,1	-	28,1	-
17	56,1	1,03	56,0	-	56,0	-
18	12,2	0,75 (s)	12,0	0,75 (s)	11,9	0,72 (s)
19	19,7	1,38 (s)	19,5	1,38 (s)	17,9	1,19 (s)
20	36,3	1,38	36,1	-	36,1	-
21	18,5	0,94 (d; 6,5)	18,7	0,93 (d; 6,5)	18,6	0,93 (d; 6,5)
22	34,1	1,35; 1,07	33,9	-	33,8	-
23	26,3	1,18	26,1	-	26,1	-
24	46,1	1,15	45,8	-	45,8	-
25	29,4	1,97	29,2	-	29,1	-
26	20,0	0,85 (d; 6,9)	19,8	0,84 (d; 6,1)	19,8	0,85 (d; 6,0)
27	19,3	0,83 (d; 6,8)	19,0	0,82 (d; 6,1)	19,0	0,82 (d; 6,1)
28	23,3	-	23,1	-	23,1	-
29	12,2	0,86 (t; 7,5)	12,0	0,85 (t; 6,7)	11,9	0,86 (t; 6,8)

Deslocamento químico δ_{C} e δ_{H} em ppm e constante de acoplamento (J , entre parêntese) em Hz

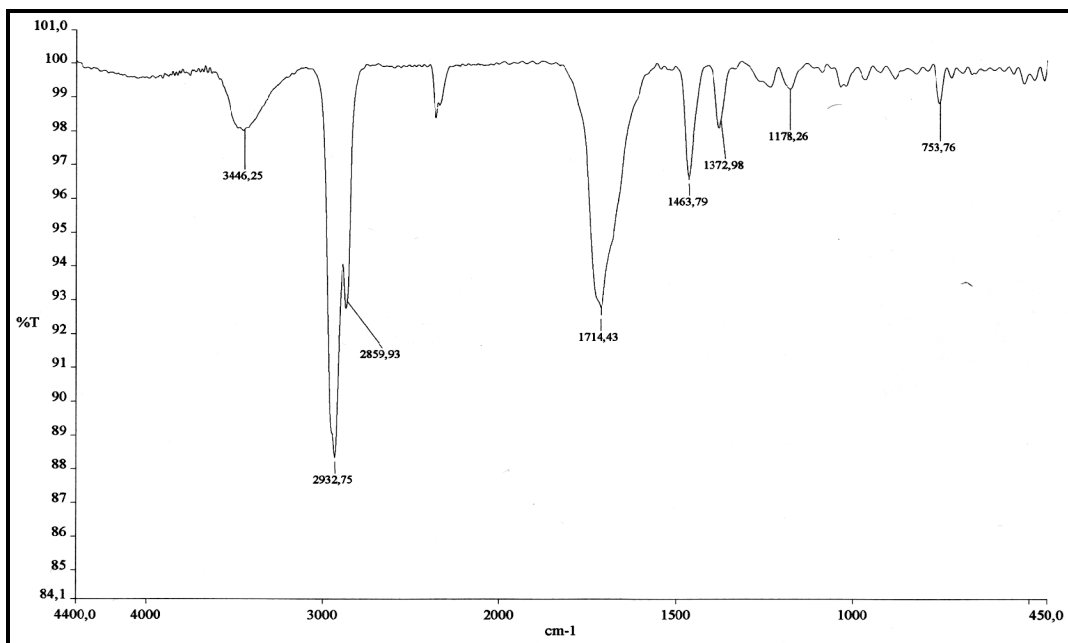


Figura 73 – Espectro de absorção na região do IV (NaCl, cm⁻¹) de CRTH-3 (135 e 136)

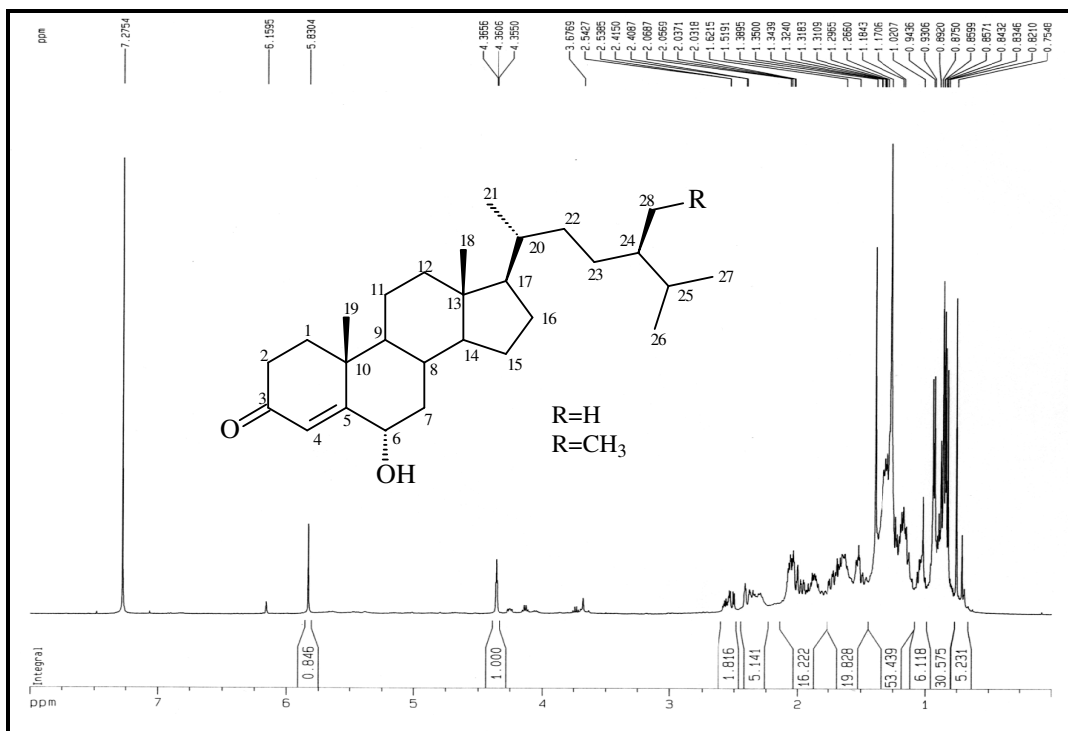


Figura 74 – Espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] de CRTH-3 (135 e 136)

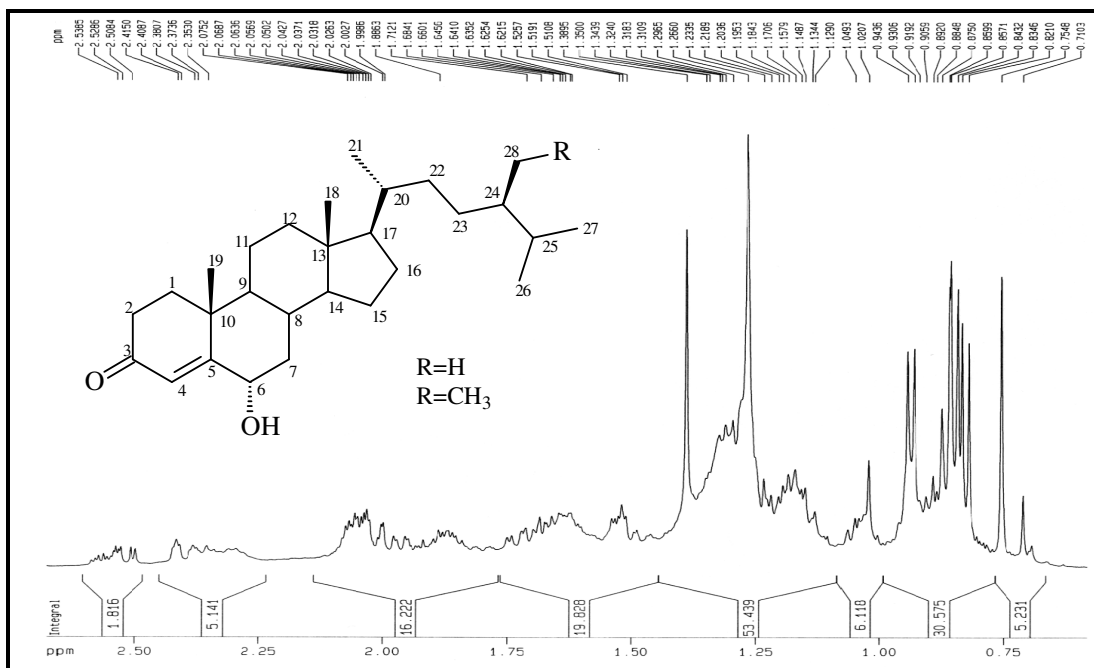


Figura 75 - Espectro de RMN ^1H - expansão [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

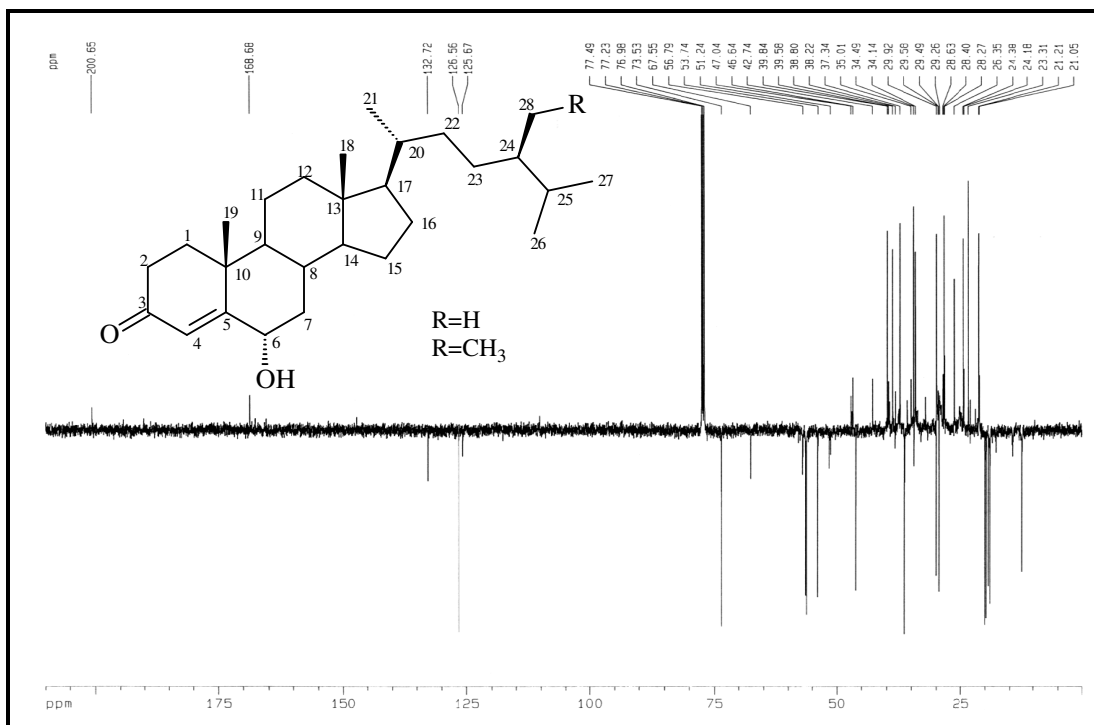


Figura 76 – Espectro de RMN ^{13}C -APT [125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

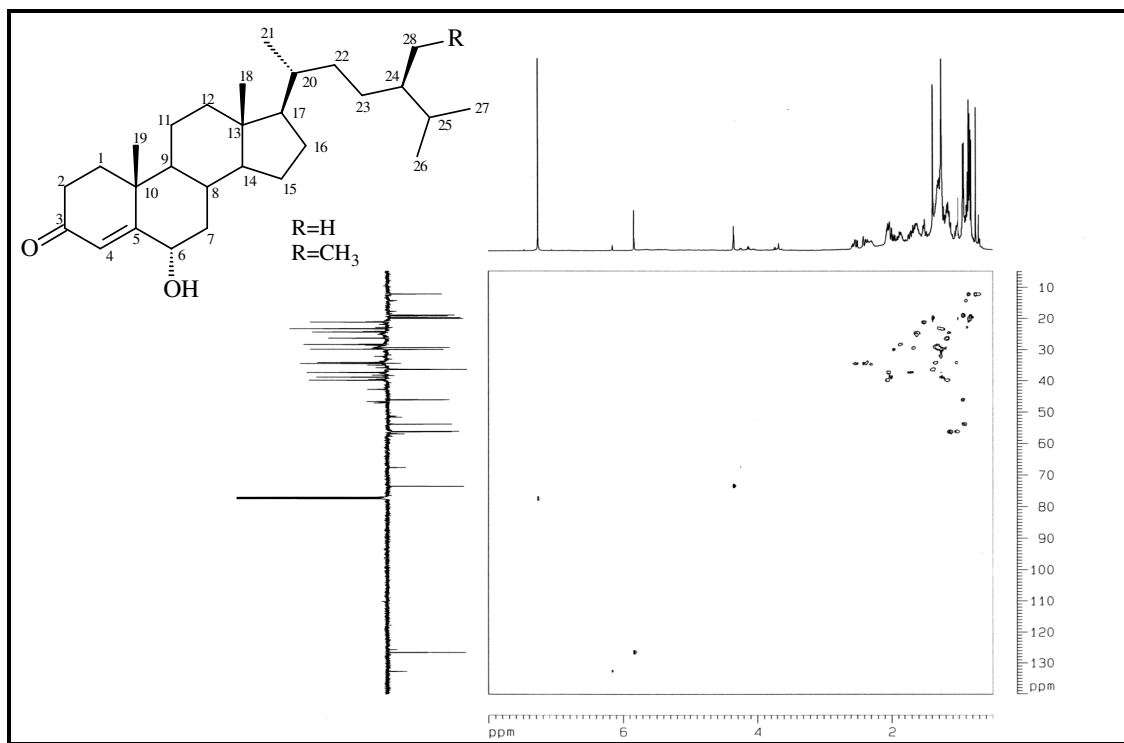


Figura 77 – Espectro de RMN HMQC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

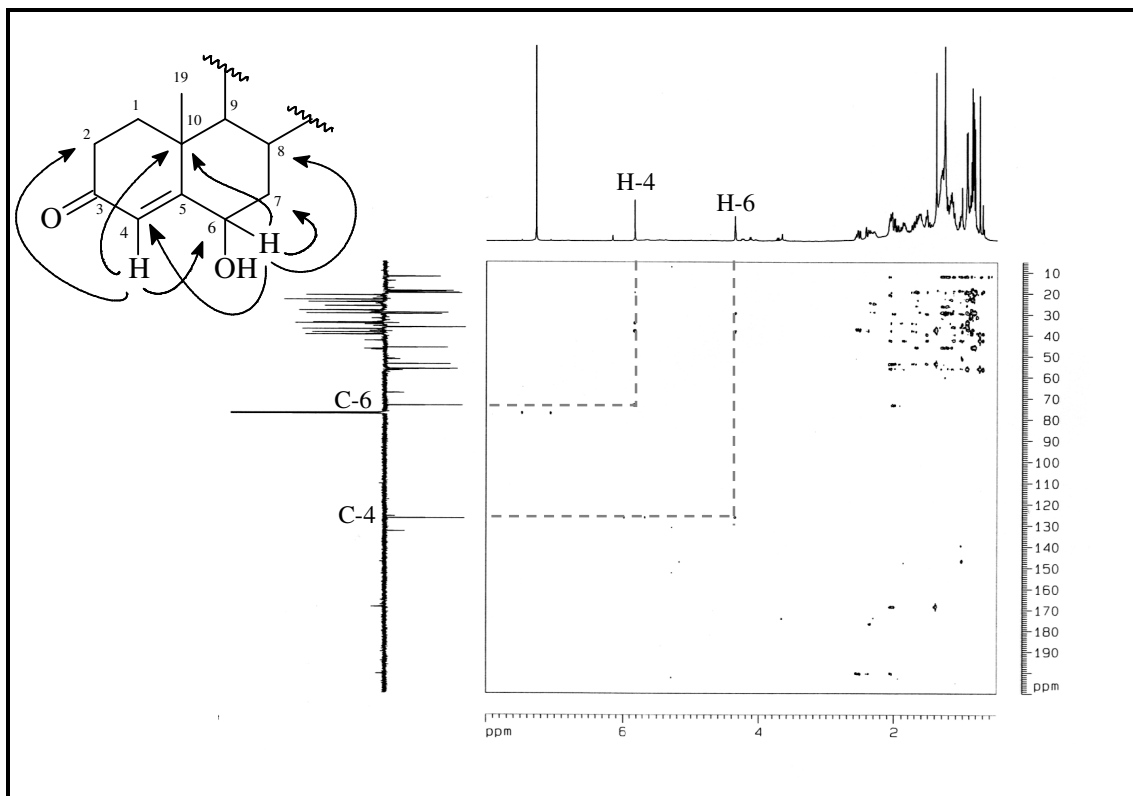


Figura 78 – Espectro de RMN HMBC [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

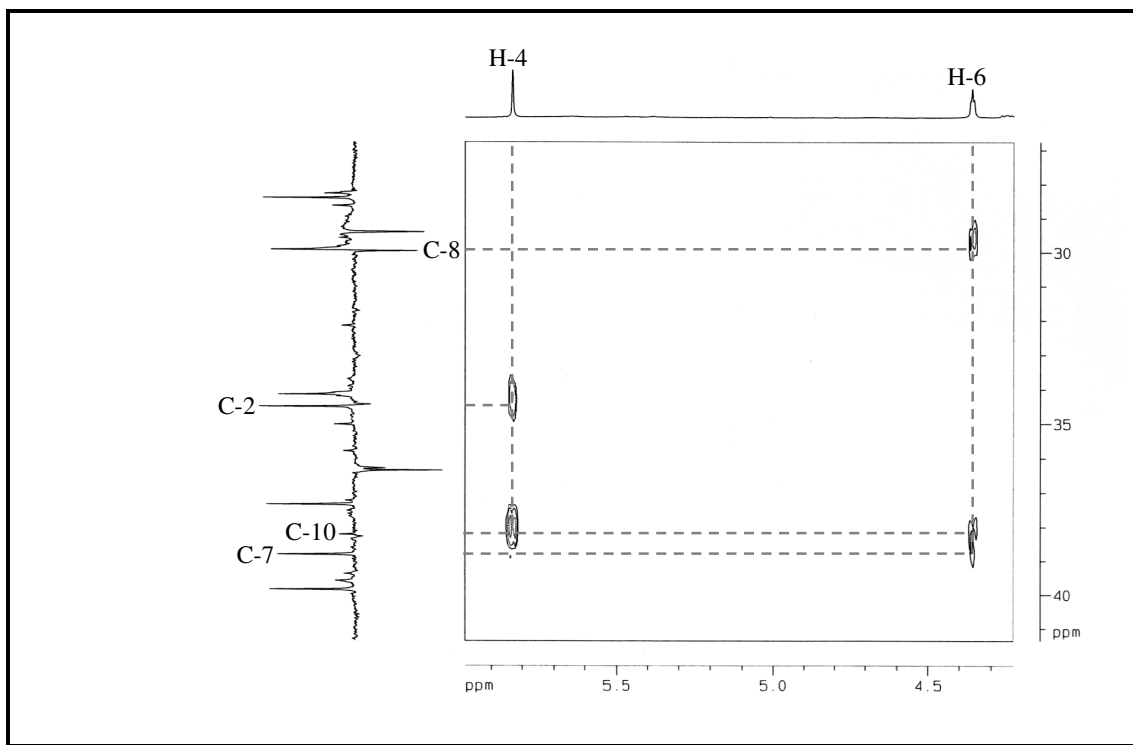


Figura 79 – Espectro de RMN HMBC – expansão [500 e 125 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

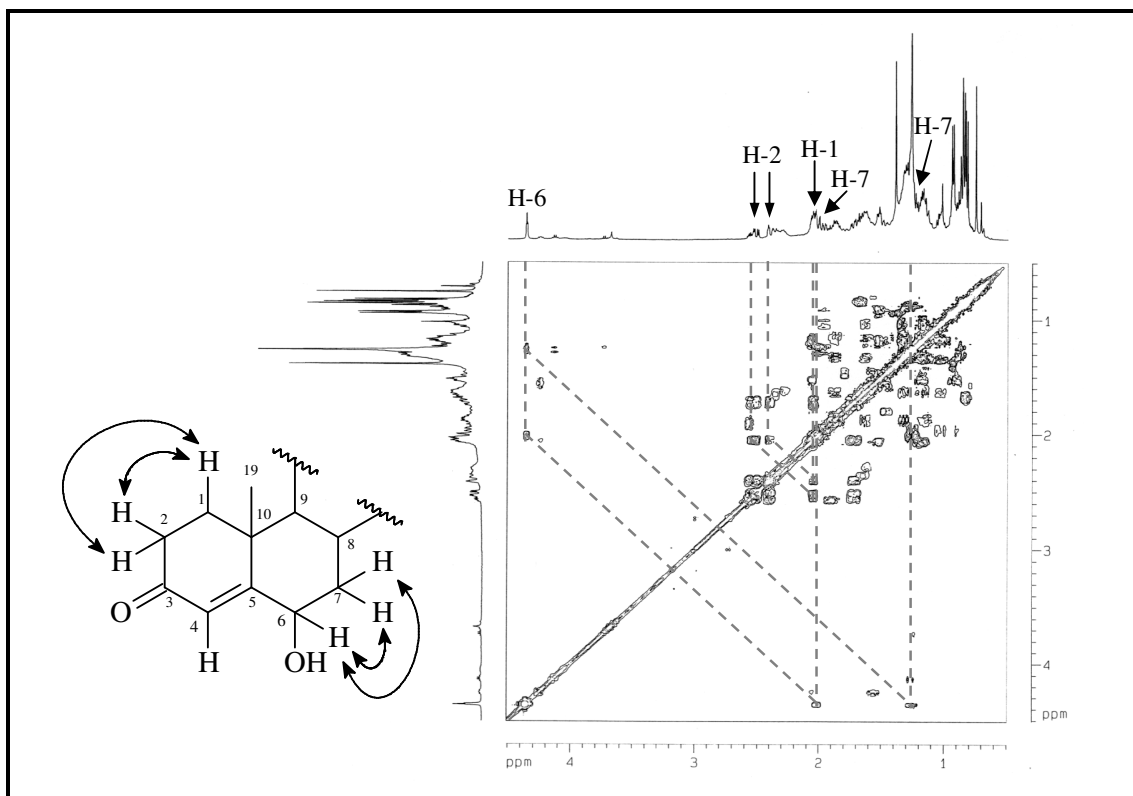


Figura 80 – Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

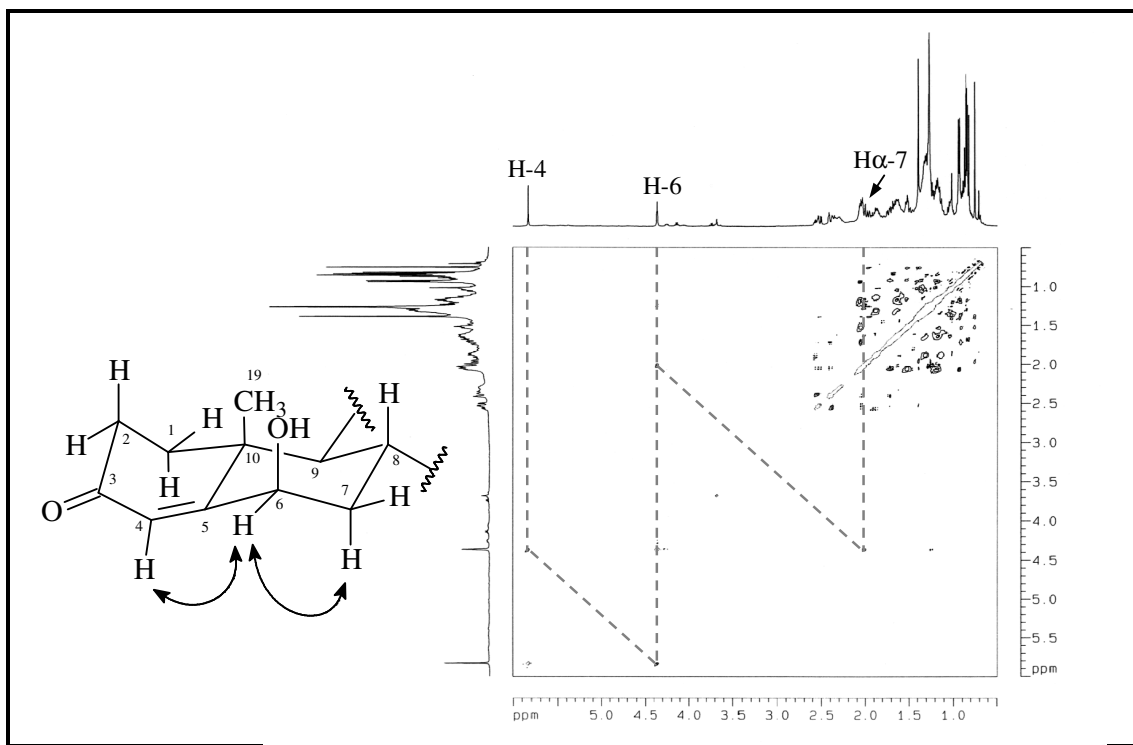


Figura 81 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, CDCl_3] de CRTH-3 (135 e 136)

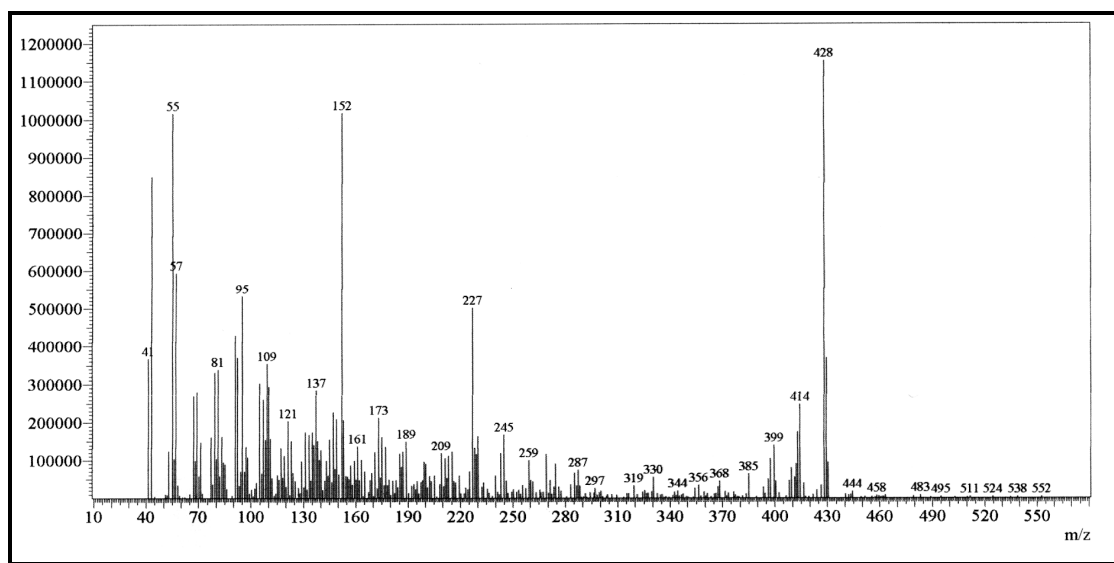


Figura 82 – Espectro de massas de CRTH-3 (135 e 136)

3.2.2.2 – Determinação estrutural de CRFH-3 (137)

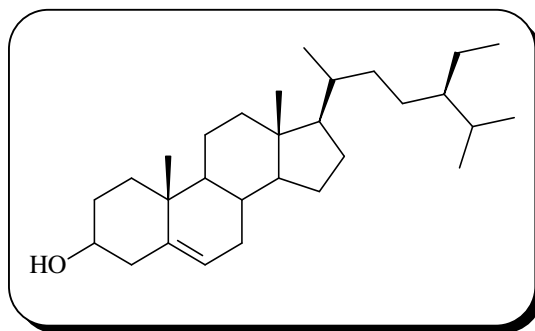
CRFH-3 foi isolado da fração CH_2Cl_2 , do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus* (item 4.4.3.3, pág. 126, Fluxograma 3, pág. 130) sob a forma de cristais aciculares.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 83, pág. 94) apresentou uma banda em 3427 cm^{-1} compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em 2935 e 2868 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$; uma banda em 1645 cm^{-1} que pode ser associadas a vibrações de deformação axial C=C de alcenos, além da banda em 1053 cm^{-1} , associada às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

A análise do espectro de RMN ^1H e ^{13}C revelou que CRFH-3 tratava-se de um composto esteroide. O espectro de RMN ^{13}C -BB [75 MHz, CDCl_3] (Fig. 84, pág. 94) apresentou vinte e nove linhas espectrais majoritárias, sendo que dois destes sinais encontram-se na região de ligação dupla. De acordo com o espectro DEPT 135° (Fig.85, pág. 95), os sinais em δ_{C} 141,0 (C) e 121,9 (CH) caracterizam uma ligação dupla trissubstituída.

O espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] (Fig. 85, pág. 94) mostrou a presença de um hidrogênio na região de olefinas em δ_{H} 5,35 (d, $J= 4,95\text{ Hz H-6}$), um hidrogênio em δ_{H} 3,52 (m, H-3) pertencente a carbono carbinólico e um número significativo de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos hibridizados sp^3 , revelando a natureza esteroide do composto isolado.

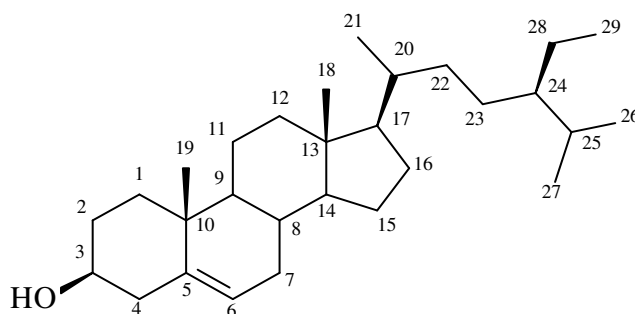
Estes dados, aliados à análise do espectro de RMN ^{13}C de CRFH-3 e comparação com dados descrito na literatura (Kojima *et al*, 1990) permitiram identificar a estrutura do esteróide comumente encontrado em plantas, β -sitosterol para CRFH-3 (Tabela 22, pág. 93).



β - sitosterol (137)

Tabela 22 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C -BB de CRFH-3 (CDCl_3 , 75 MHz) e comparação com os dados descritos na literatura para o β -sitosterol (CDCl_3 , 100 MHz) (Kojima *et al.*, 1990)

C	CRFH-3	β -sitosterol
	δ_{C}	δ_{C}
1	37,0	37,2
2	29,4	31,6
3	72,0	71,8
4	42,6	42,3
5	141,0	140,7
6	121,9	121,7
7	31,9	31,9
8	32,1	31,9
9	50,4	50,1
10	36,7	36,5
11	21,3	21,1
12	40,0	39,8
13	42,5	42,3
14	57,0	56,8
15	24,5	24,3
16	28,6	28,2
17	56,3	56,0
18	12,1	11,9
19	19,6	19,4
20	36,4	36,1
21	19,3	18,8
22	34,2	33,9
23	26,4	26,0
24	46,1	45,8
25	29,4	29,1
26	20,0	19,8
27	19,0	19,0
28	23,3	23,0
29	12,2	12,0



CRFH-3

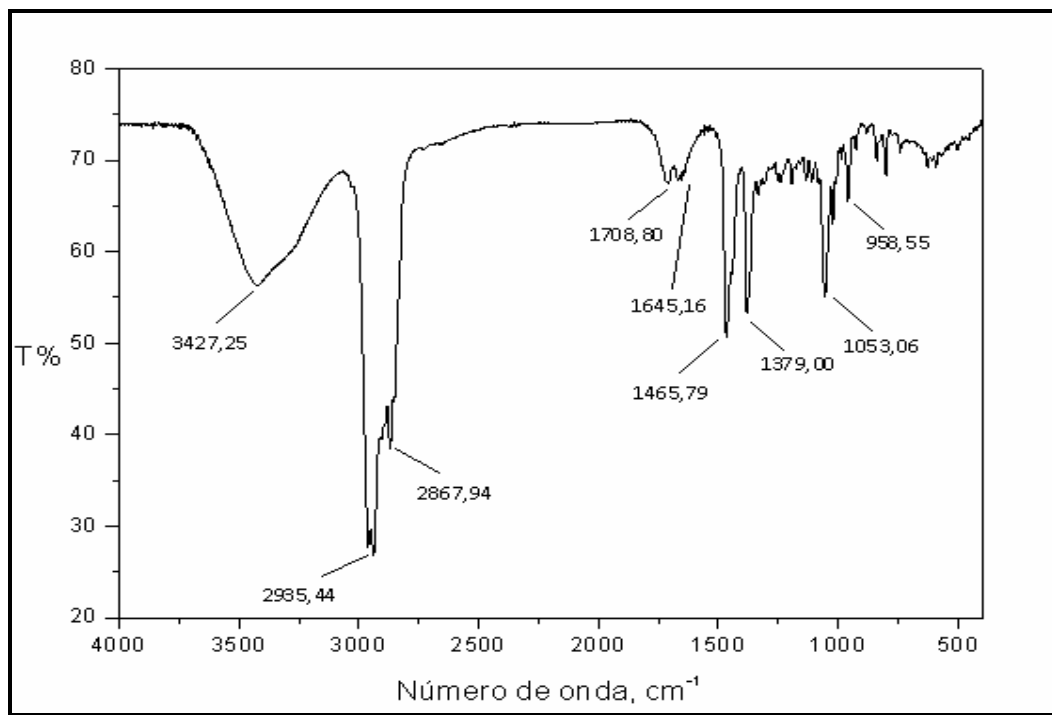


Figura 83 – Espectro de absorção na região do IV (KBr cm^{-1}) de CRFH-3 (137)

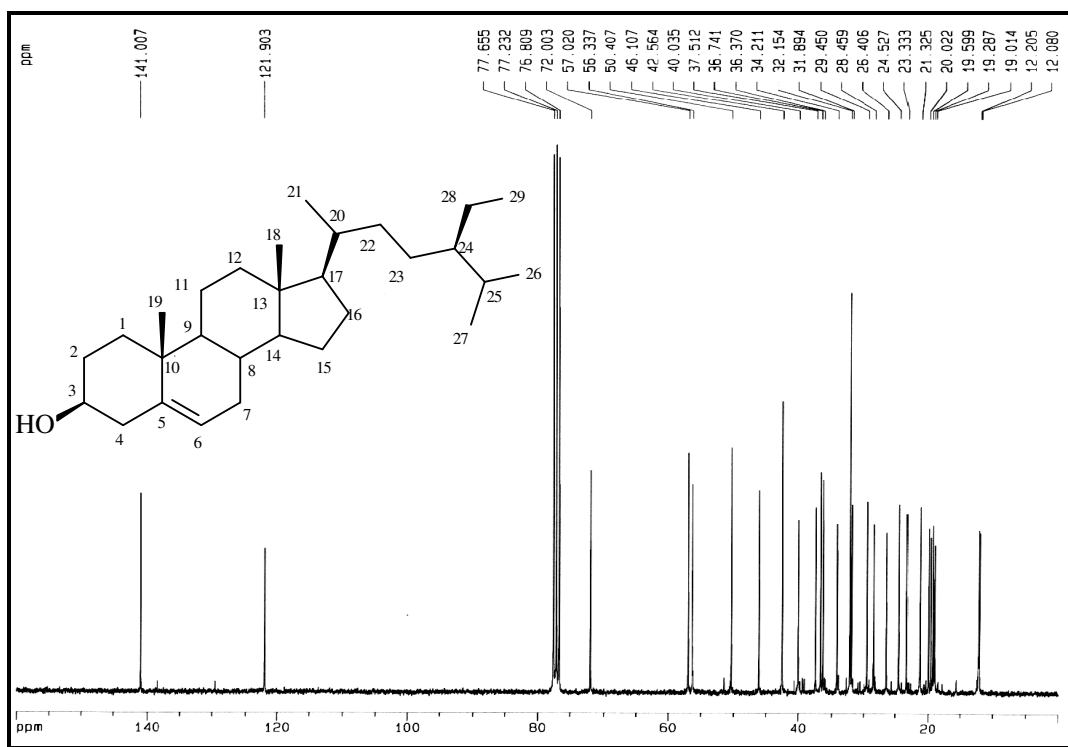


Figura 84 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD [75 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (137)

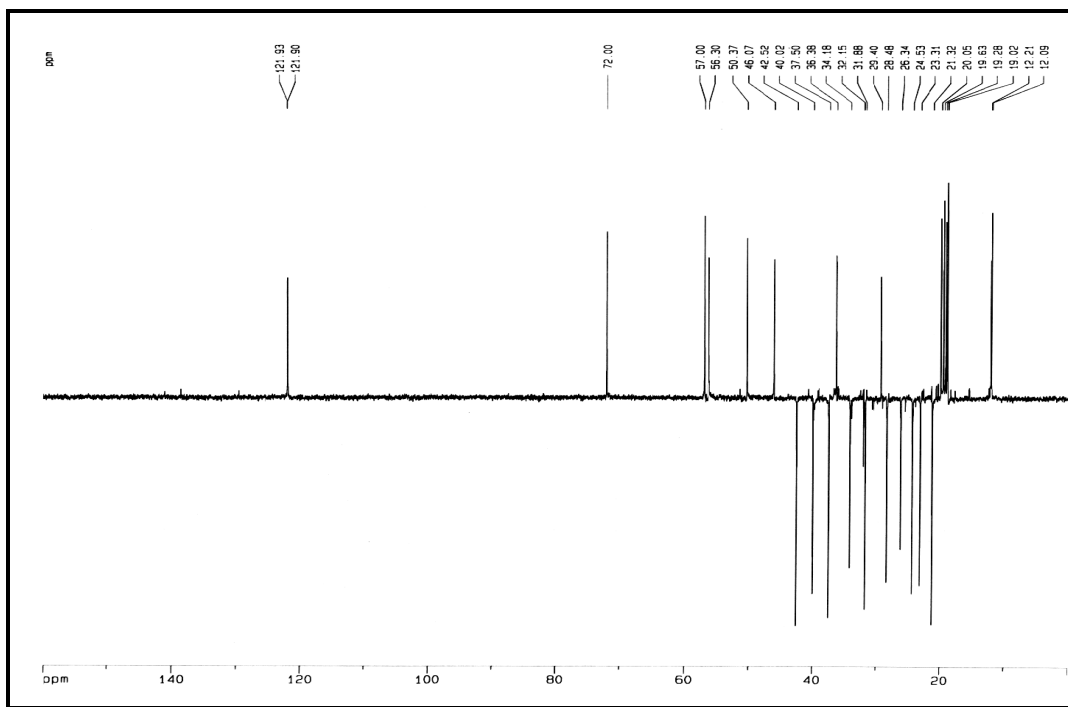


Figura 85 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CRFH-3 (137)

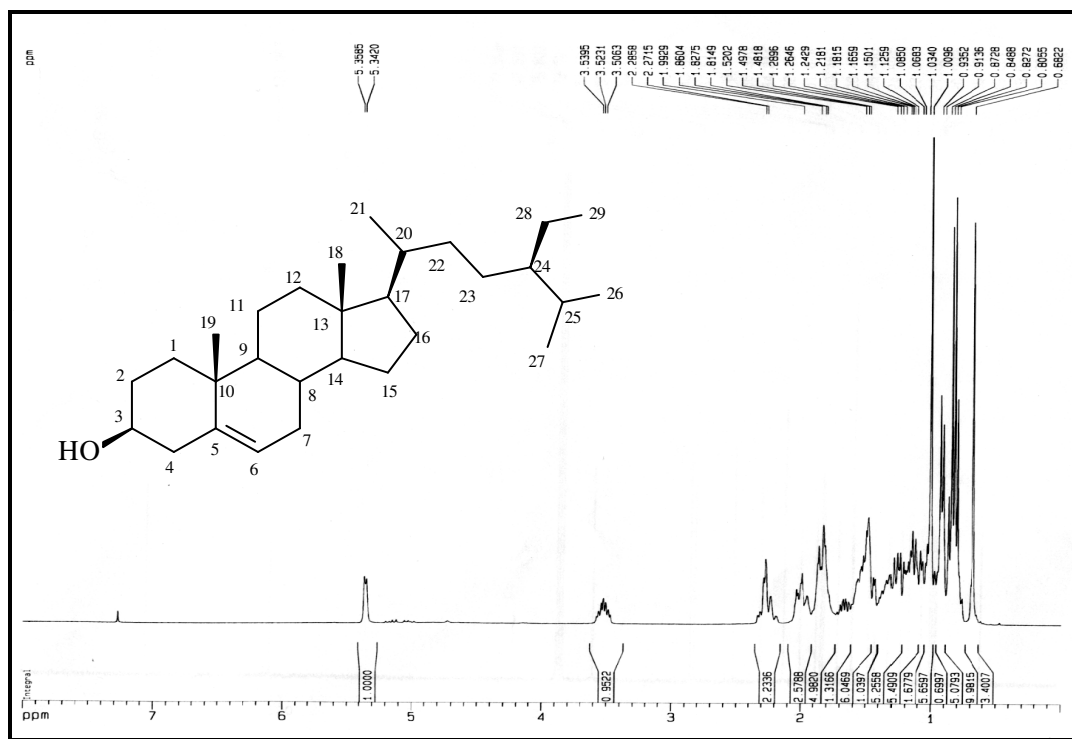


Figura 86 – Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] de CRFH-3 (137)

3.2.2.3 – Determinação estrutural de CRFE-2 (138)

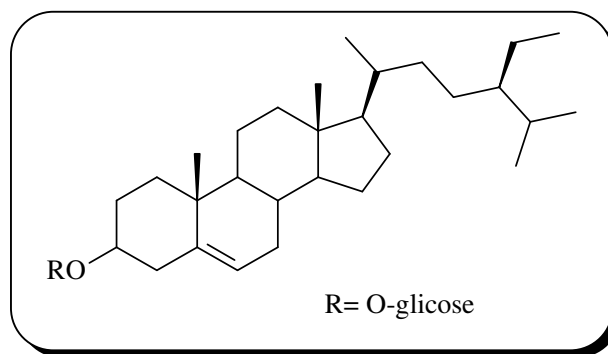
A substância codificada de CRFE-2 foi isolada da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *C. regelianus*, sob a forma de um sólido branco amorfo (item 4.4.4.1, pág. 131, Fluxograma 4, pág. 134).

A análise do espectro de absorção na região de IV (Fig. 87, pág. 98) revelou uma banda larga centrada em 3410 cm^{-1} compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em 2960 e 2868 cm^{-1} , características de deformação axial de ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, uma banda em 1637 cm^{-1} que pode ser associadas a vibrações de deformação axial $\text{C}=\text{C}$ de alcenos, além das bandas intensas em 1074 e 1020 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de ligação C-O, características de éteres ou álcoois (Silverstein, 1991).

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, piridina- d_5] (Fig. 88, pág. 98), revelou um conjunto de sinais principalmente na faixa de δ_{C} 12,5 a 57,4; característico de esteróides. A presença de sinais referentes a carbonos com hibridação sp^2 em δ_{C} 122,4 e 141,5; sendo o último, de acordo com espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 89, pág. 99) referente a carbono metínico, portanto consistente com os deslocamentos químicos δ_{C} 141,5 (C-5) e 122,4 (C-6) do esteróide glicosilado β -sitosterol.

Os sinais adicionais em δ_{C} 103,1; 79,1; 78,7; 75,8; 72,2 e 63,4 são compatíveis com aqueles descritos na literatura (Tabela 23, pág. 97) para unidade de açúcar.

Estas informações juntamente com os dados obtidos no espectro RMN ^1H [500 MHz, piridina- d_5] (Fig. 90, pág. 98), bem como a comparação dos deslocamentos químicos de carbono com os descrito na literatura (Kojima, 1990), (Tabela 23, pág. 97), permitiram identificar CRFE-2 como sendo o esteróide β -sitosterol glicosilado.



β -Sitosterol-3-O-glicosila (138)

Tabela 23 – Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -BB de CRFE-2 (δ , piridina- d_5 , 125 MHz) com os dados descritos na literatura para o β -sitosterol glicosilado (δ , piridina- d_5 , 100 MHz)

Carbono	CRFE-2 δ_{C}	β -sitosterol glicosilado* δ_{C}
1	38,0	37,6
2	30,8	30,3
3	78,9	78,3
4	39,9	39,4
5	141,5	141,0
6	122,5	122,0
7	32,7	32,2
8	32,6	32,1
9	50,9	50,4
10	37,4	37,0
11	21,8	21,4
12	40,5	40,0
13	43,0	42,6
14	57,4	57,0
15	25,0	24,6
16	29,0	28,7
17	56,8	56,3
18	12,5	12,0
19	19,7	19,3
20	36,9	36,5
21	19,5	19,1
22	34,8	34,3
23	27,0	26,4
24	46,6	46,1
25	30,3	29,5
26	19,9	19,5
27	20,5	20,1
28	23,9	23,4
29	12,7	12,2
1'	103,1	102,6
2'	75,8	75,4
3'	79,1	78,7
4'	72,2	71,7
5'	78,9	78,5
6'	63,4	62,9

*Kojima *et al*, 1990

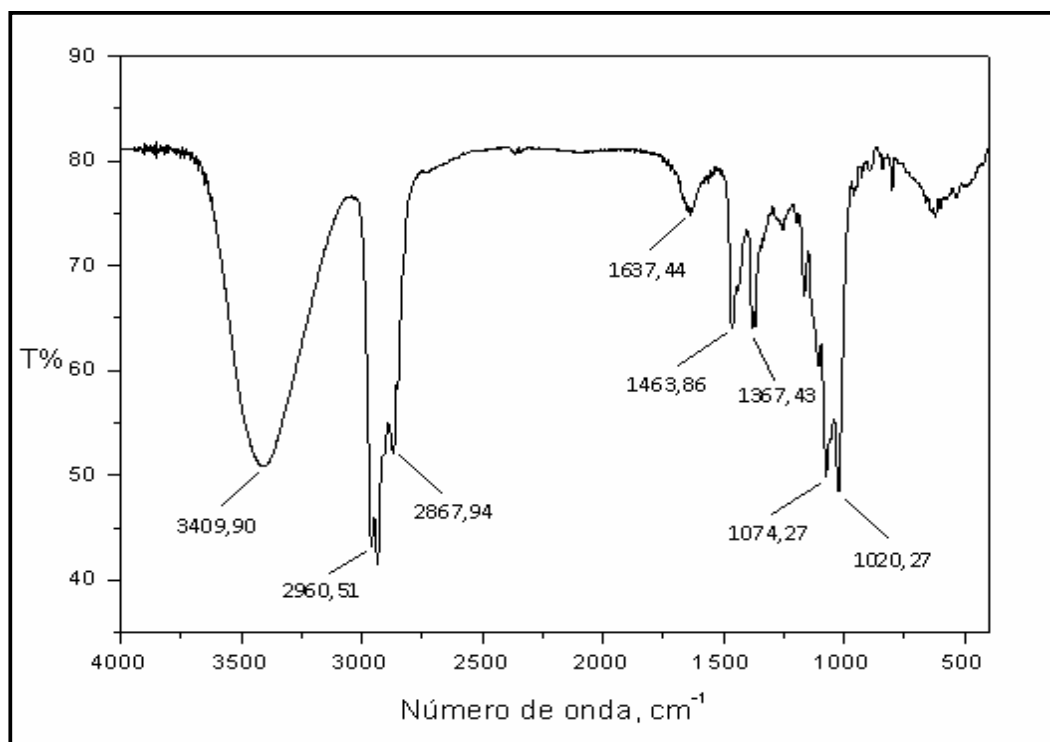


Figura 87 – Espectro de absorção na região do IV (KBr cm⁻¹) de CRFE-2 (138)

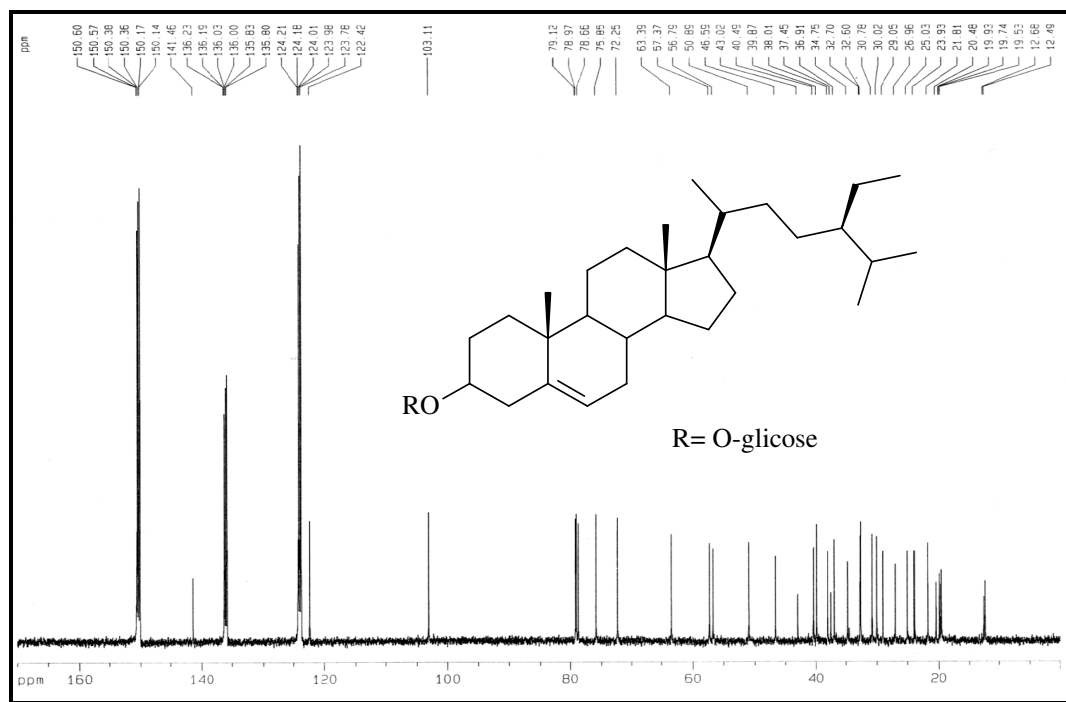


Figura 88 – Espectro de RMN ¹³C-CPD [125 MHz, piridina-d₅] de CRFE-2 (138)

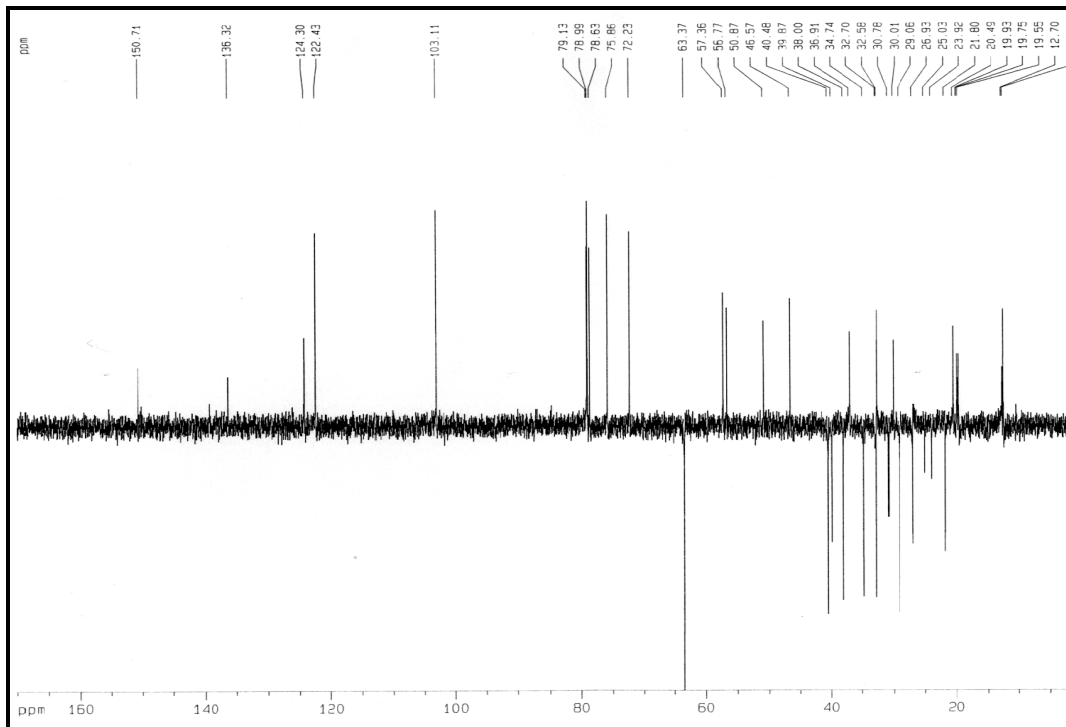


Figura 89 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, piridina- d_5] de CRFE-2 (138)

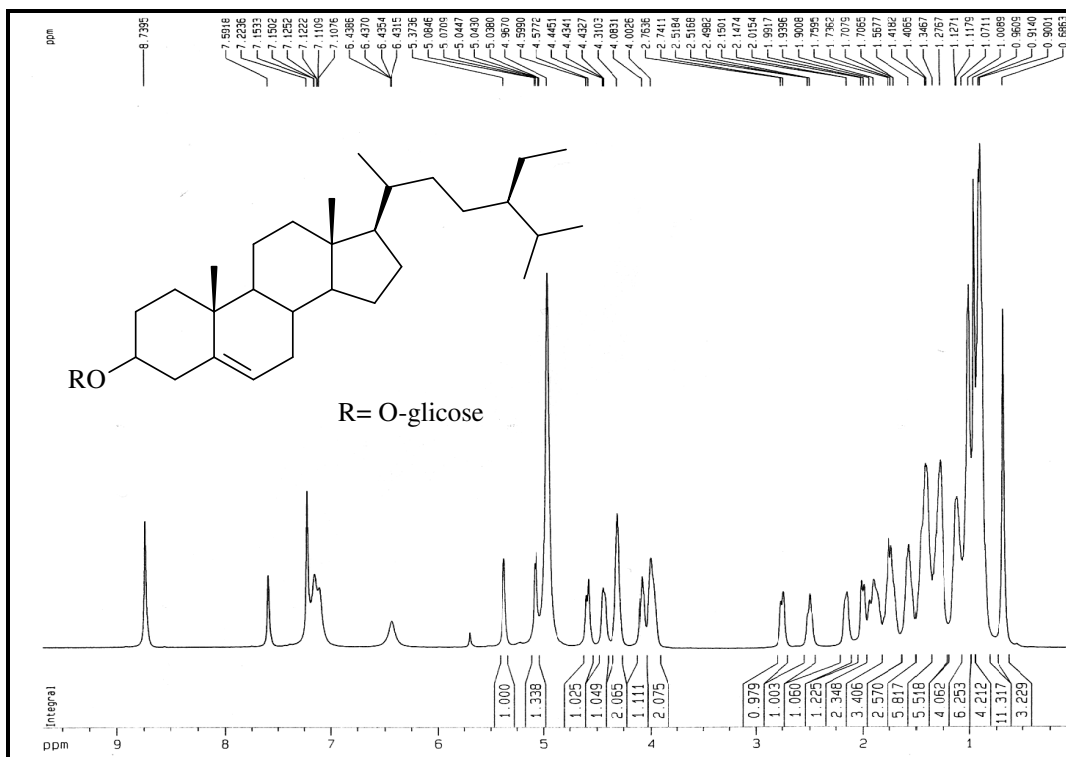


Figura 90 – Espectro de RMN ^1H [500 MHz, piridina- d_5] de CRFE-2 (138)

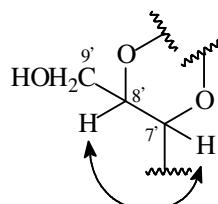
3.2.3. - Determinação estrutural de Cumarina

3.2.3. 1 - Determinação estrutural de CRTE-1 (139)

A fração diclorometano, oriunda da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. regelianus*, (item 4.4.6.1, pág. 140, Fluxograma 6, pág. 143), após sucessivas cromatografias possibilitou o isolamento de um sólido cristalino, com ponto de fusão na faixa de 246,0-247,4 °C, denominado CRTE-1.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 91, pág. 107) mostrou uma banda em 3453 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação OH, uma banda em 1703 cm^{-1} , relacionada a deformação axial da ligação C=O de carbonila conjugada; além das bandas em 1613 a 1446 cm^{-1} , características de deformação axial da ligação C=C de aromáticos e em 1280 a 1059. cm^{-1} , correspondentes à deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, piridina- d_5] (Fig. 92, pág. 107) exibiu seis sinais na região de hidrogênio ligada a carbono sp^2 , dois deles compatíveis com hidrogênio ligado a carbono de ligação dupla com configuração *cis*, em δ_{H} 6,45 (d; 9,4; H-3) e 7,75 (d; 9,4; H-4) e três característicos de um sistema AMX em δ_{H} 7,43 (s; H-2'); 7,31 (d; 8,0; H-5') e 7,37 (dl; 8,0; H-6'). O espectro mostrou ainda sinais em δ_{H} 4,49 (d; 8,1; H-8'); 5,60 (d; 8,1; H-7') e 4,34 (dl; 14,0; H-9') referentes aos hidrogênios oximetínicos/oximetilênicos de um fragmento do tipo $-\text{CH}(\text{OR})-\text{CH}(\text{OR})-\text{CH}_2-\text{OH}$, conclusão confirmada através dos acoplamentos vicinais observados no espectro COSY (Fig. 95, pág. 109) entre o hidrogênio em δ_{H} 4,49 (dl; 8,1; H-8') com os hidrogênios em δ_{H} 5,60 (d; 8,1; H-7'), conforme mostra a sub-estrutura (I). Adicionalmente, o espectro de RMN ^1H mostrou sinais em δ_{H} 3,8 (s) e 3,72 (s) ressaltando a existência de duas metoxilas na estrutura de CRTE-1.



(I)

Os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° [125 MHz, piridina- d_5] (Figs. 93 e 94, pág.108) apresentaram sinais correspondentes a vinte átomos de carbono, sendo nove

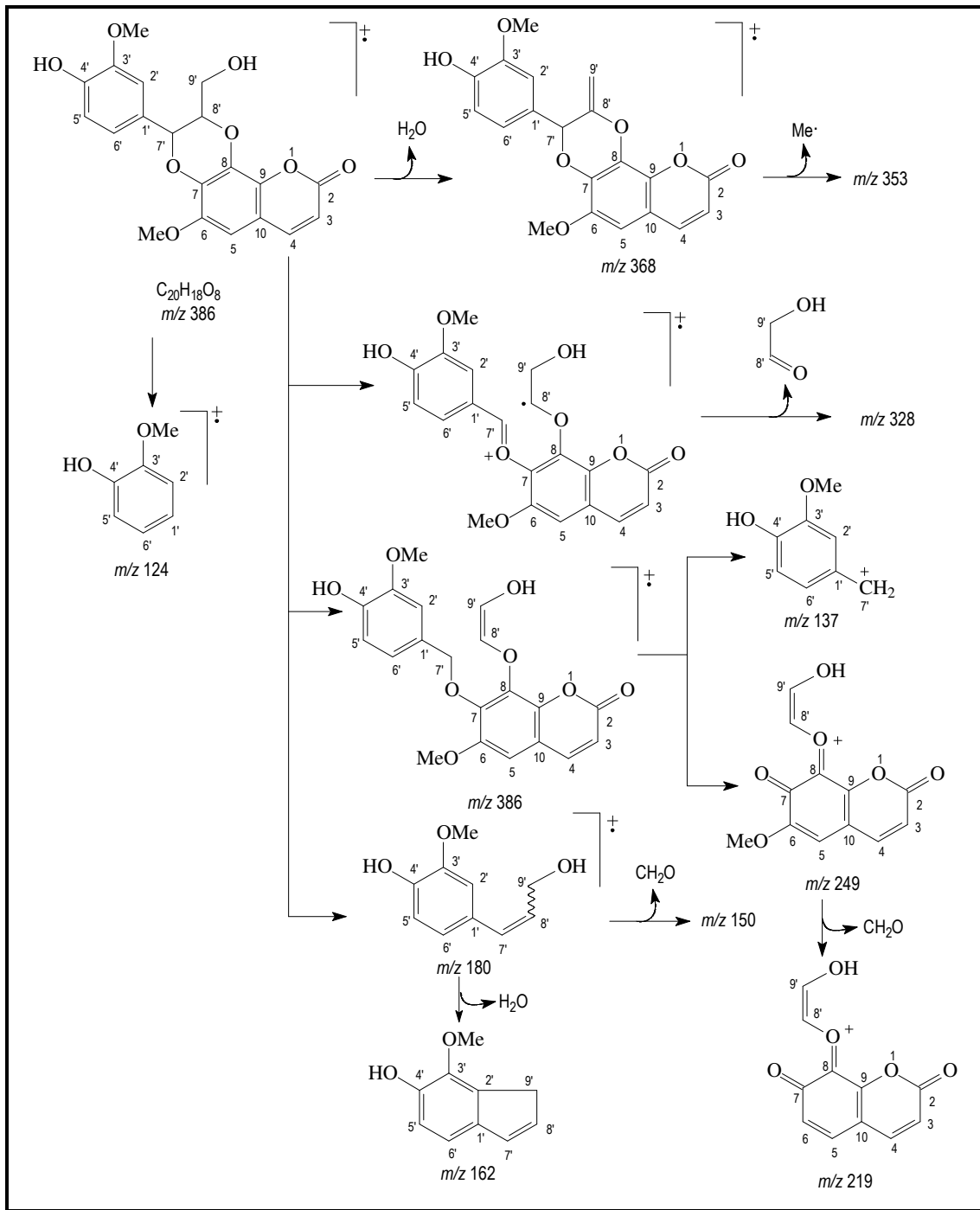
carbonos não-hidrogenados (δ_C 161,2; 149,5; 149,3; 146,8; 139,8; 139,0; 133,5; 128,0 e 112,4); oito carbonos metínicos: seis dos quais com hibridação sp^2 (144,9; 122,1; 114,3; 112,7; 101,5) e dois com hibridação sp^3 e oxigenado (δ_C 78,0 80,4); um carbono oximetilênico (δ_C 61,2) e dois carbonos metílicos (δ_C 56,6 e 56,2) de grupos metoxilas, como mostra a Tabela 24 (pág. 101).

Os dados descritos, juntamente com o espectro de massas (Fig. 96, pág. 108), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, o qual forneceu o pico correspondente ao íon-molecular $[M]^+$ em m/z 386 Daltons, possibilitaram inferir para CRTE-1 a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_8$. Este experimento forneceu também outros picos importantes, cujas fragmentações estão ilustradas no quadro 6, pág. 102.

O número de átomos de carbono com hibridação sp^2 , aliado aos sinais de carbono relativo a uma carbonila e uma dupla ligação, cujos hidrogênios apresentam uma relação *cis*, foi possível inferir um núcleo cumarínico para CRTE-1.

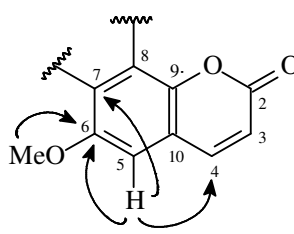
Tabela 24 – Padrão de hidrogenação determinado através de análise comparativa entre nos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de CRTE-1

C	CH	CH₂	CH₃	Fórmula Molecular
161,2	114,3	61,2	56,6	
146,8	149,9		56,2	
138,9	112,7			
133,5	117,0			
139,8	122,1			
112,4	78,0			
128,0	80,4			
149,3				
149,5				
9C	7CH	1CH₂	2CH₃	C₂₀H₁₈O₈
O número de átomos de oxigênio foi deduzido com base no deslocamento de cada átomo de carbono				

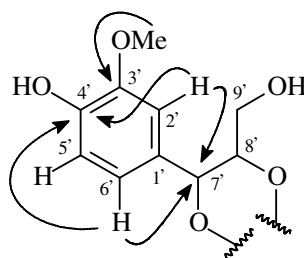


Quadro 7 - Proposta mecânica para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massas de CRTE-1

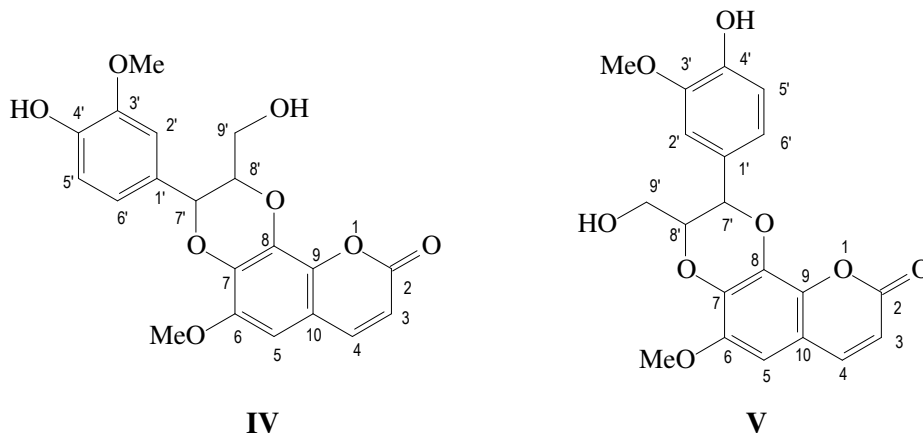
O espectro HSQC (Fig. 97, pág. 110) permitiu associar inequivocamente os sinais de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos, vide Tabela 25 (pág. 106), enquanto as correlações a duas e três ligações observadas no espectro HMBC (Fig. 98 a 100, pág. 110 e 111) possibilitaram o posicionamento dos substituintes no núcleo cumarínico. Uma metoxila foi posicionada no carbono C-6, apoiada na correlação do hidrogênio em δ_H 3,80 (H₃CO-6) com o carbono em δ_C 146,8 (C-6, $^3J_{CH}$) e do hidrogênio em δ_H 6,74 (H-5) com os carbonos em δ_C 146,8 (C-6, $^2J_{CH}$), δ_C 138,9 (C-7, $^3J_{CH}$) e 144,9 (C-4, $^3J_{CH}$). A feição singleto apresentada para o hidrogênio em δ_H 6,74 (H-5) justifica a substituição nos carbonos 7 e 8 (sub-estrutura **II**).

**(II)**

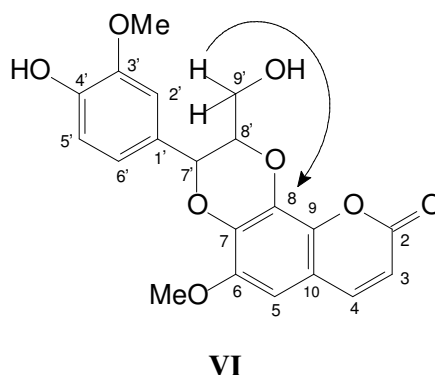
As correlações a três ligações, observada neste espectro, entre os sinais relativos aos hidrogênios em δ_H 7,43 (H-2') e 7,31 (H-6') do anel aromático, com os carbonos em δ_C 149,5 (C-4') e 78,0 (C-7'), bem como dos hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,72 (H₃CO-3') com o carbono em δ_C 149,3 (C-3', $^3J_{CH}$) levou a construção da sub-estrutura **(III)**, a qual poderia está ligada nas posições 7 e 8 do núcleo cumarínico, gerando as possibilidades estruturais **IV** e **V**.

**(III)**

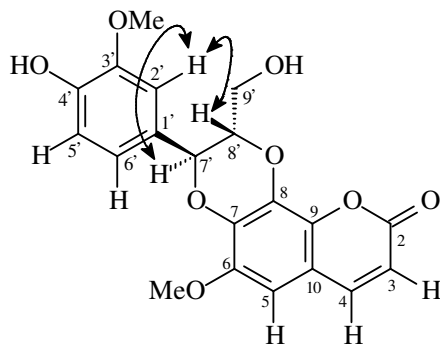
A comparação dos dados de RMN ^{13}C de CRTE-1 com dados disponíveis na literatura para as cumarinas cleomiscosina A (**IV**) e cleomiscosina B (**V**) (Tabela 25, pág. 106) (Ray *et al.*, 1985) não possibilitou a elucidação estrutural do referido composto, em virtude dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de ambos isômeros serem muito próximos.



Deste modo, foi necessária a realização de um novo experimento HMBC, utilizando um valor da constante de acoplamento heteronuclear igual a 2 Hz, valor este menor do que o do anterior (8 Hz). Neste experimento observou-se a correlação a quatro ligações, rara para este tipo de sistema, do hidrogênio em δ_H 3,93 (H-9') com o carbono em δ_C 133,5 (C-8) (estrutura VI), sugerindo para CRTE-1 a estrutura IV. Adicionalmente o ponto de fusão na faixa de 246,0-247,4 °C para CRTE-1 está em concordância com o ponto de fusão (247,0 °C) da cleomiscosina A (Ray *et al.*, 1985).

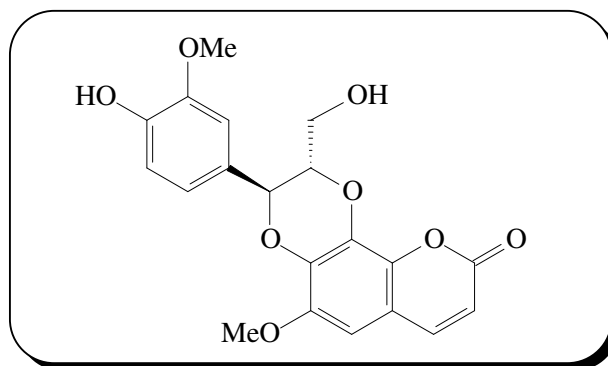


A configuração relativa dos estereocentros C-7' e C-8', foi deduzida através do espectro NOESY (Fig. 101 pág. 112), o qual revelou interações espaciais do hidrogênio em δ_H 7,43 (H-2') com os hidrogênios em δ_H 5,60 (H-7') e 4,49 (H-8'), indicando uma relação *trans* entre os hidrogênios H-7' e H-8' (estrutura VII). A relação *trans* inferida para os referidos hidrogênios está em consonância com o valor da constante de acoplamento (8,1 Hz) calculada para os hidrogênios H-7' e H-8'.



(VII)

Com base na análise exposta acima e comparação com dados descritos na literatura, CRTE-1 foi caracterizado como sendo a cumarina conhecida por cleomiscosina A. Este metabólito, apesar de já possuir registro na literatura, está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Croton*.



Cleomiscosina A (139)

Tabela 25 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (piridina- d_5) de CRTE-1 e comparação dados de RMN ^{13}C da literatura (Ray *et al.*, 1985) para cleomiscosina A e B.

C	CRTH-1		Cleomiscosina A	Cleomiscosina B
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2	161,2	-	160,8	160,7
3	114,3	6,45 (d; 9,4)	113,6	113,8
4	144,9	7,75 (d; 9,4)	144,5	144,4
5	101,5	6,74 (s)	101,1	101,2
6	146,8	-	146,3	146,2
7	138,9	-	138,4	138,1
8	133,5	-	133,0	133,2
9	139,8	-	139,3	139,4
10	112,4	-	111,9	111,8
1'	128,0	-	127,5	127,5
2'	112,7	7,43 (sl)	112,3	112,3
3'	149,3	-	150,0	150,1
4'	149,5	-	149,0	149,1
5'	117,0	7,31 (d; 8,0)	116,6	116,5
6'	122,1	7,37 (dl; 8,0)	121,7	121,7
7'	78,0	5,6 (d; 8,1)	77,5	77,1
8'	80,4	4,49 (dl; 8,1)	79,9	80,2
9'	61,1	4,34 (dl; 14,0)	60,7	61,1
		3,93 (dl; 14,0)		
MeO-6	56,6	3,80 (s)	56,2	56,1
MeO-3'	56,2	3,72 (s)	55,8	55,9

Deslocamentos químicos δ_{C} e δ_{H} em ppm e constante de acoplamento (J , entre parêntese) em Hz

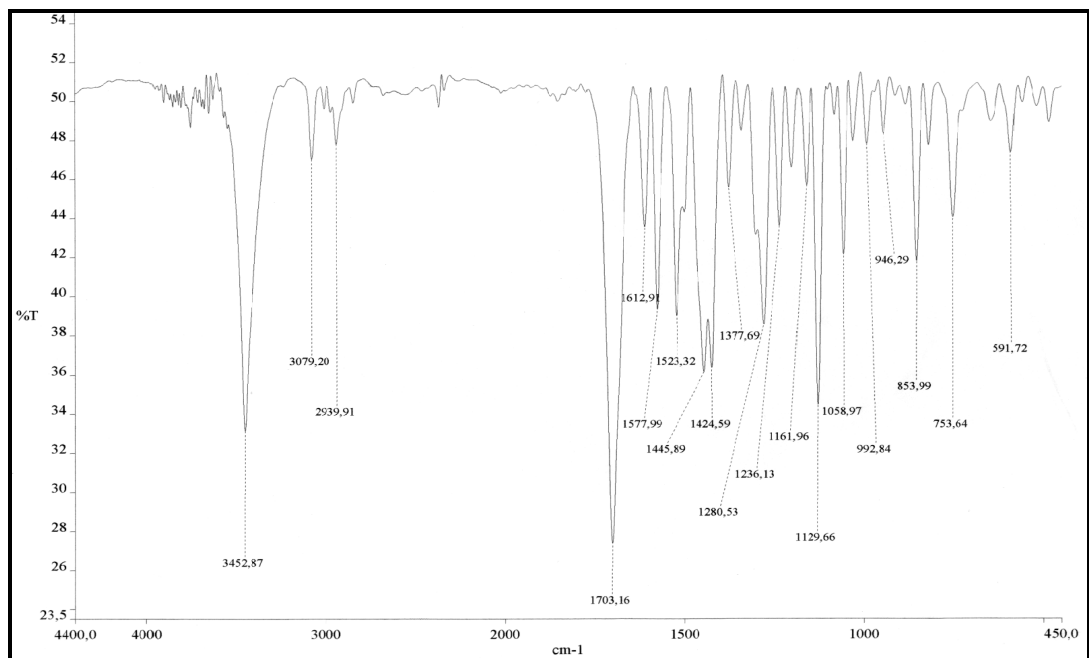


Figura 91 – Espectro de absorção na região do IV (KBr, cm⁻¹) de CRTE-1 (139)

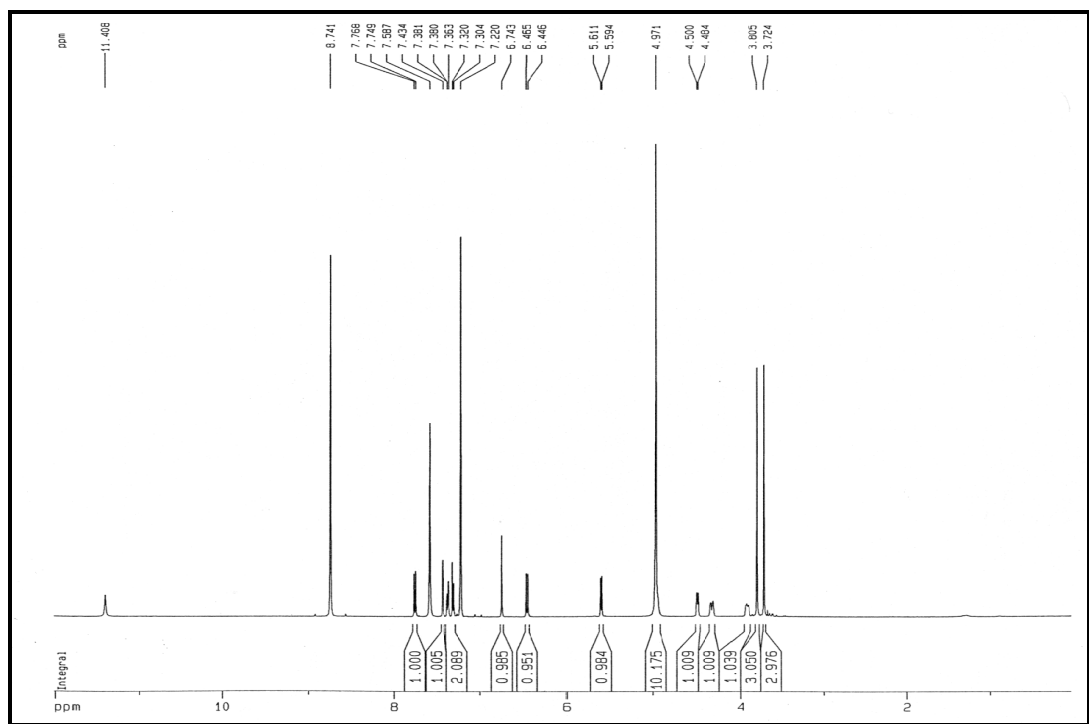


Figura 92 – Espectro de RMN ¹H [500 MHz, piridina-*d*₅] de CRTE-1 (139)

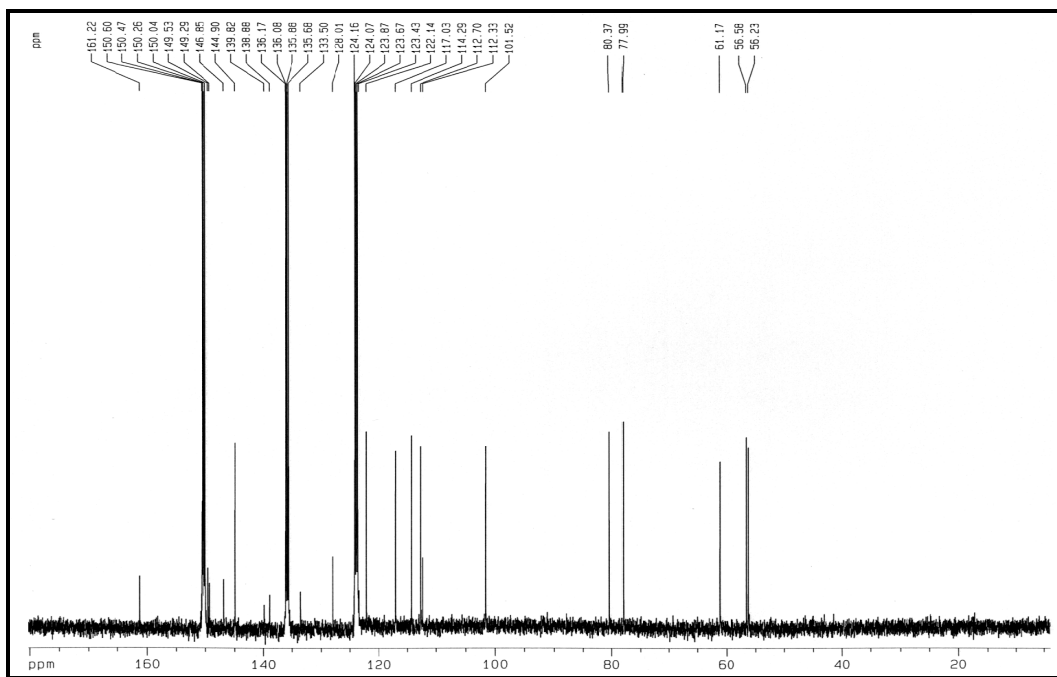


Figura 93 – Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

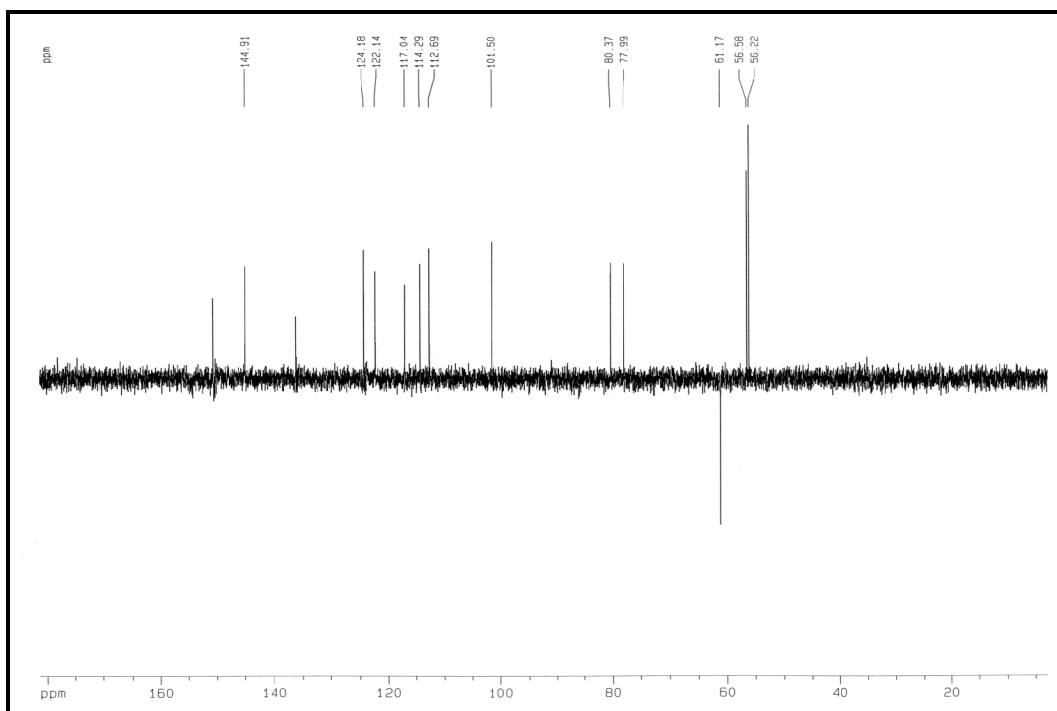


Figura 94 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

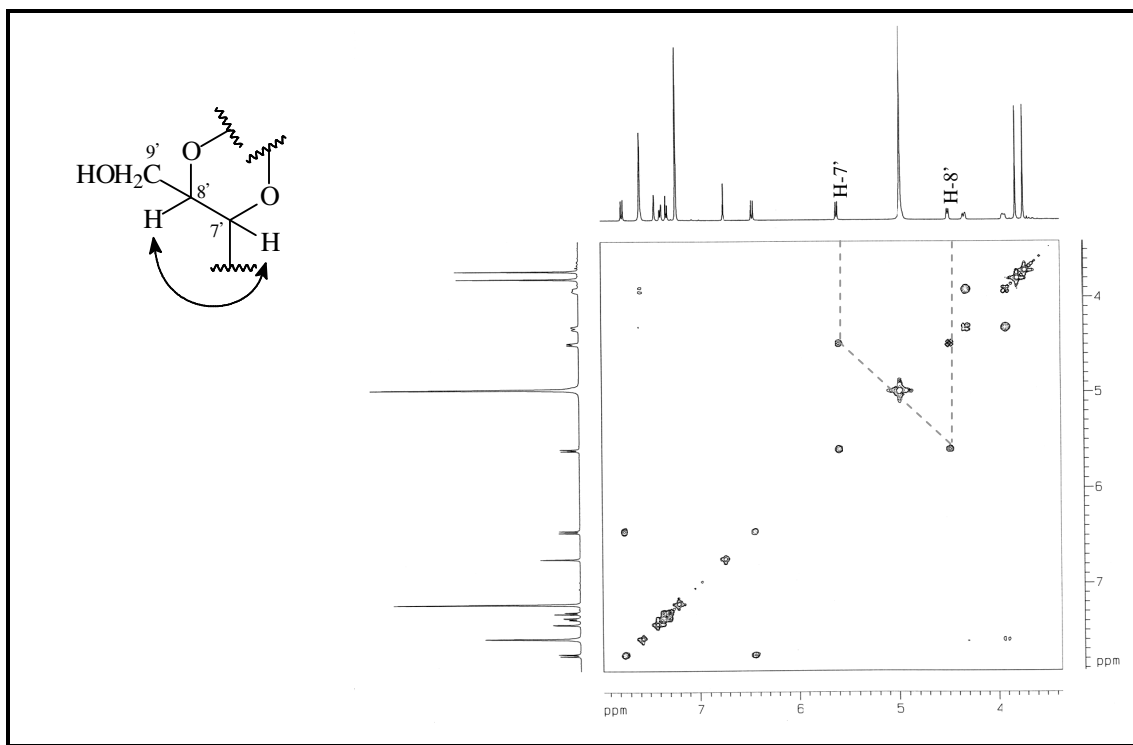


Figura 95 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -COSY- [500 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

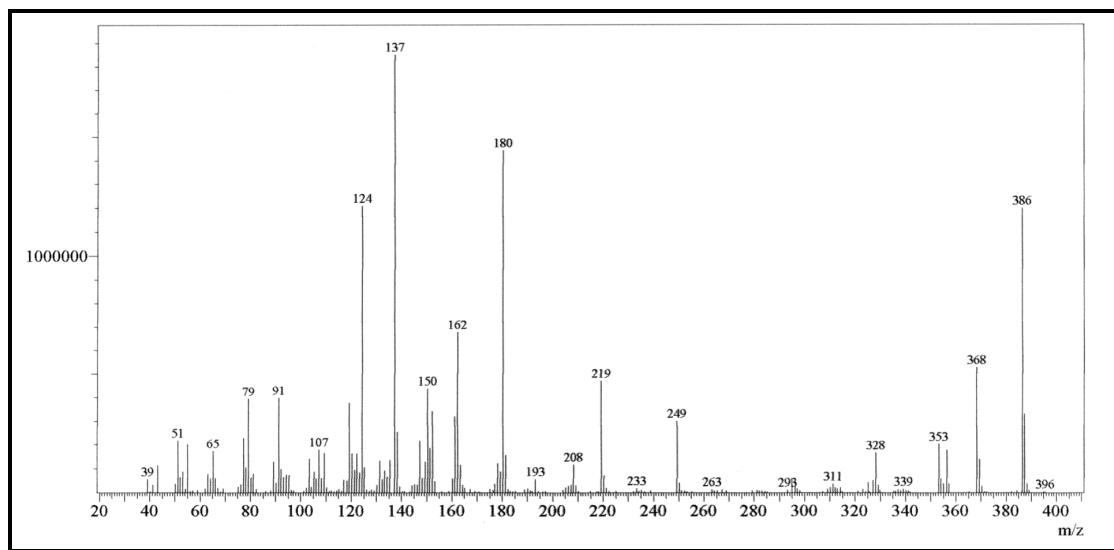


Figura 96 – Espectro de massas de CRTE-1 (139)

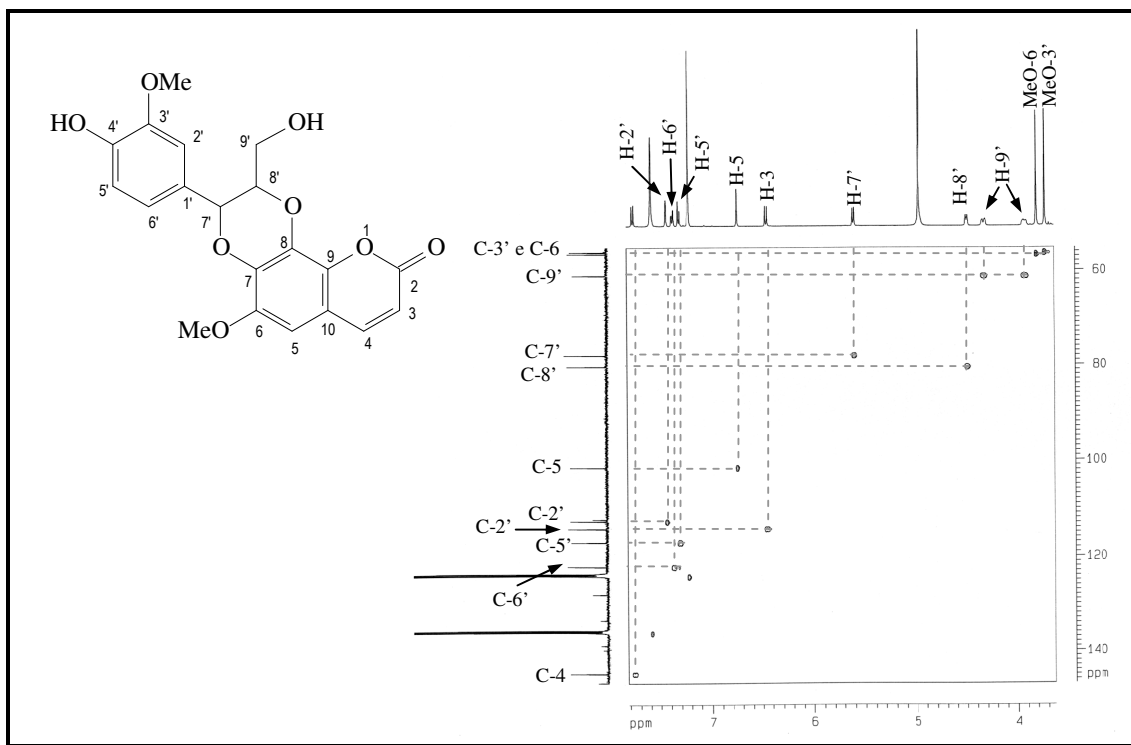


Figura 97 – Espectro HSQC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

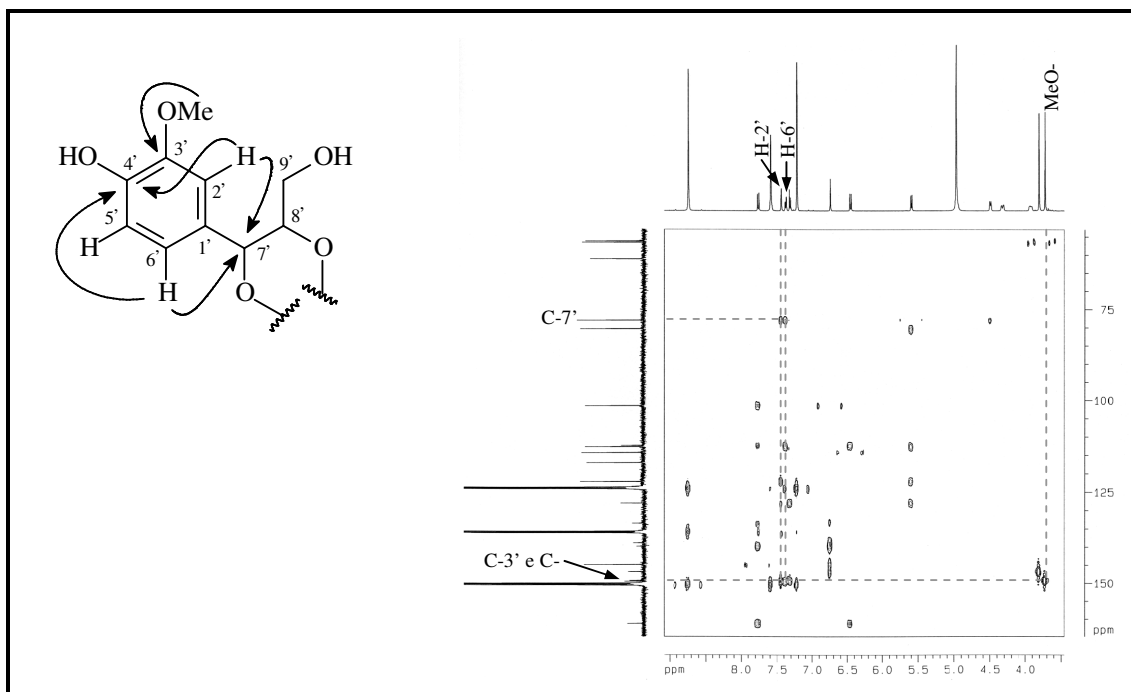


Figura 98 – Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

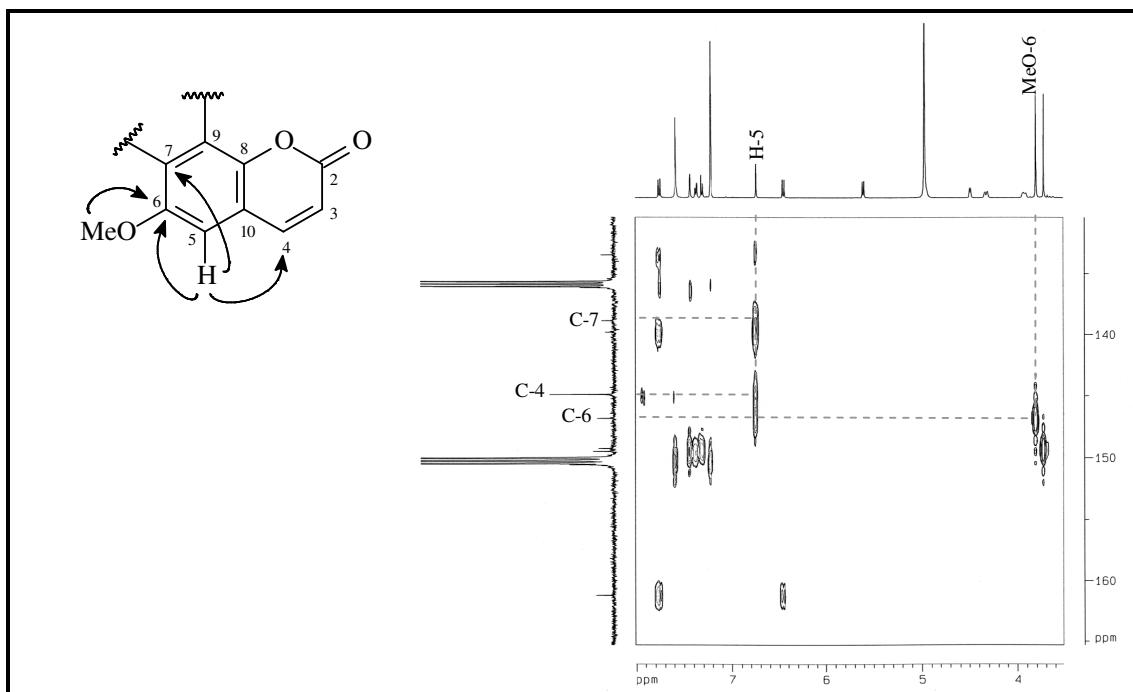


Figura 99 – Espectro HMBC- expansão [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

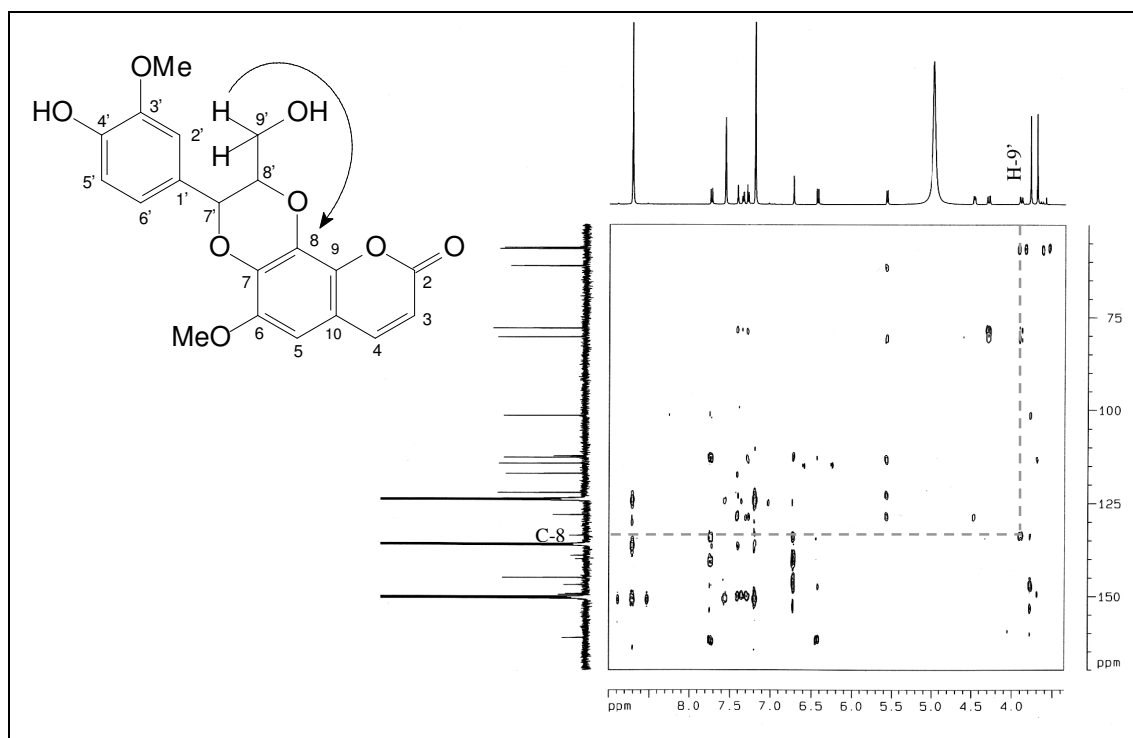


Figura 100 – Espectro HMBC- [500 e 125 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

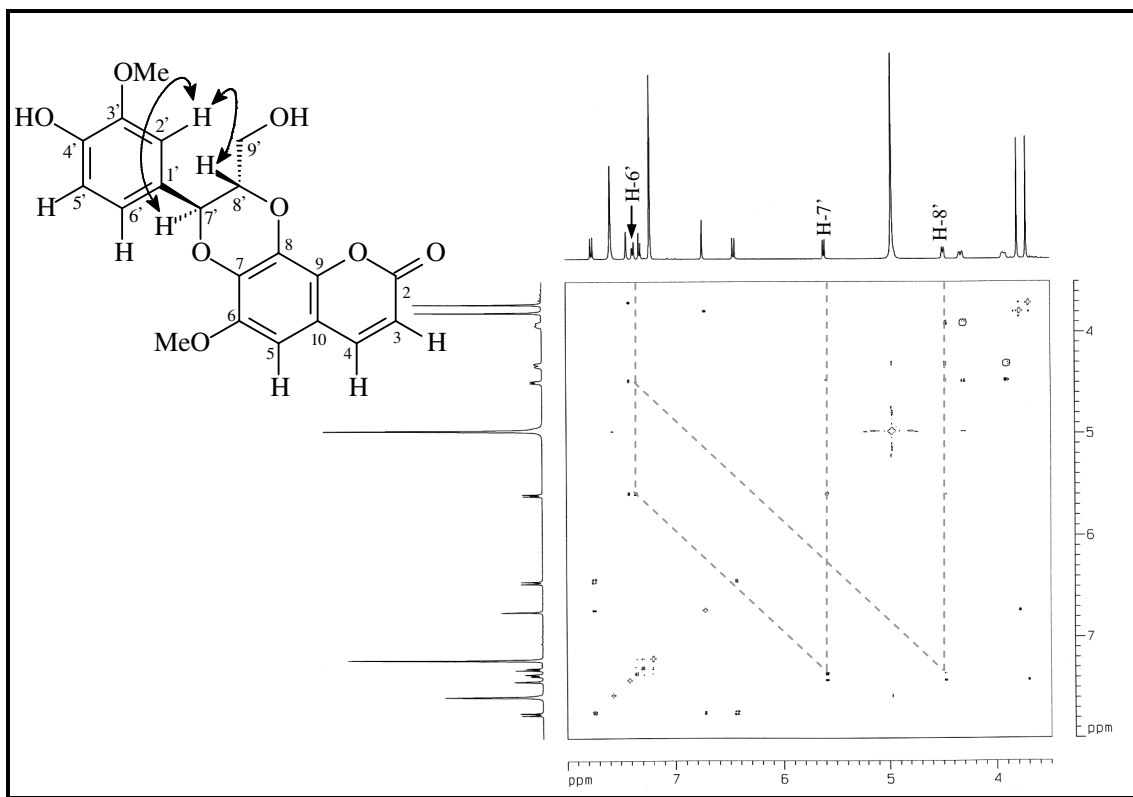


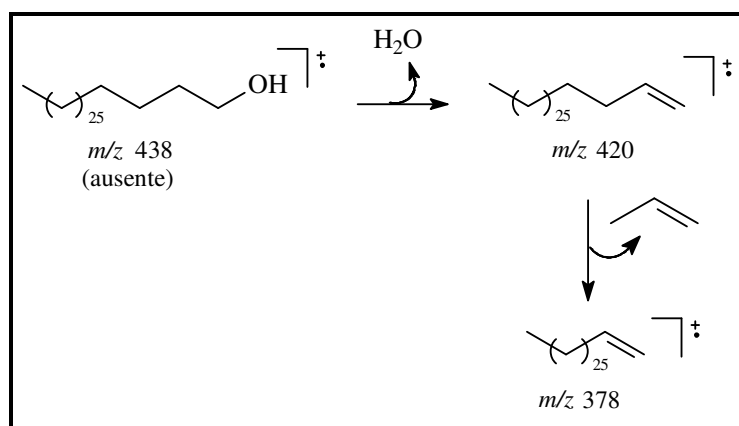
Figura 101 – Espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, piridina- d_5] de CRTE-1 (139)

3.2.4 – Determinação estrutural de CRFH-1 (140)

O tratamento cromatográfico da fração CRFH-D2, oriunda da fração CH_2Cl_2 do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus* (item 4.4.3.2, pág. 125), resultou no isolamento de 49,6 mg de um sólido branco amorfo, codificado por CRFH-1, com ponto de fusão na faixa 81,2 – 82,4°C.

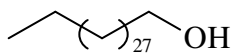
Este metabólito após ser comparado por CCD com amostra padrão, foi identificado como sendo o triacontanol.

O espectro de massas (Fig. 102, pág. 115) obtido por impacto eletrônico a 70 eV, confirmou que CRFH-1 tratava-se do triacontanol, um álcool com fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$, mesmo não apresentando o pico correspondente ao ion molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 438 Daltons. Em conformidade com o espectro, justifica-se facilmente os picos em m/z 420 Daltons, correspondente a perda de uma molécula de água ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$) e em m/z 378 Daltons, compatível com a perda de um grupo alila como uma molécula neutra ($\text{C}_{30}\text{H}_{60} - \text{C}_3\text{H}_6$), conforme mostrado no Quadro 7. Os demais picos aparecem numa seqüência de fragmentação caracterizada por aglomerados de picos afastados um dos outros por 14 unidade de massa (CH_2), que são compatíveis com os fragmentos esperados para os hidrocarbonetos de cadeia normal.



Quadro 7 - Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massas de CRFH-1

A análise do espectro de massas, bem como a comparação da faixa de fusão com o descrito na literatura, permitiu identificar este composto como sendo o triacontanol (CRFH-1 p.f. 81,2 – 82,4°C, triacontanol 81 – 82 °C, Chacko *et al.*, 2002), um álcool graxo de cadeia carbônica normal.



Triacontanol (**140**)

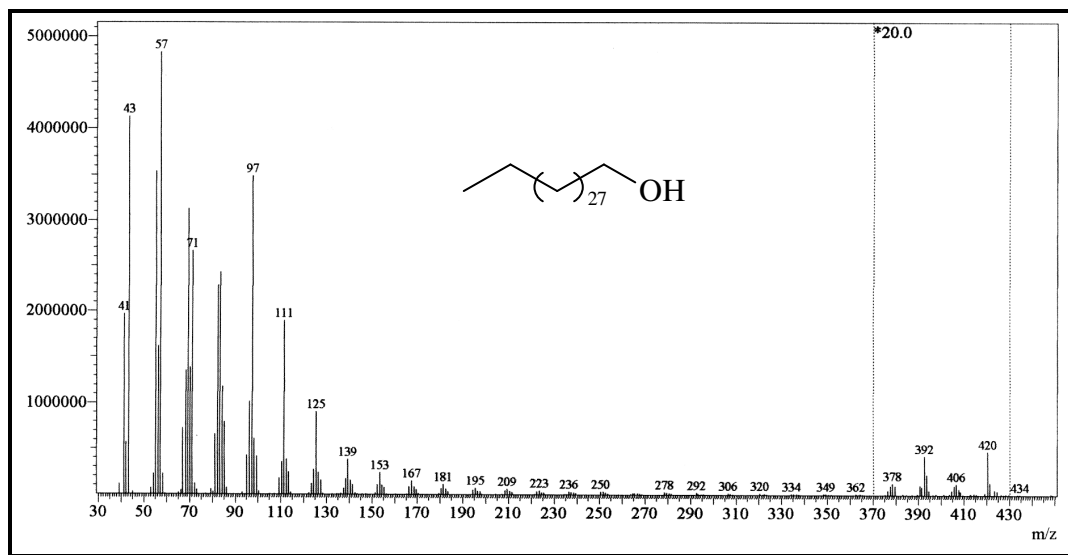


Figura 102 – Espectro de massas de CRFH-2

Capítulo 4

Parte Experimental

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Métodos Cromatográficos

4.1.1 - Cromatografia de Adsorção

As cromatografias de adsorção em coluna foram executadas utilizando gel de sílica 60, com granulometria de 70-230 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da Merck para cromatografia sob média pressão (cromatografia flash). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de sílica empregada. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob média pressão (cromatografia flash) foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregada nesta técnica, bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos Ltda. Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60, 5-40 µm, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm sobre cromatoplasmas de poliéster ou alumínio da Merck

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas através da exposição destas a radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de ondas (254 e 365 nm) emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da mineral Light, pela pulverização com solução de vanilina e ácido perclórico em etanol ou com solução de *p*-anisaldeído e ácido sulfúrico em etanol, seguido de aquecimento em estufa em 100 °C por aproximadamente 5 minutos.

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: *n*-pentano, *n*-hexano, éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, isopropanol, etanol e metanol, puros ou em misturas binárias em proporções crescentes de polaridade. Os solventes eram de qualidade P.A., destilado ou grau CLAE.

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório BUCHI.

4.1.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no laboratório de cromatografia da Universidade do Estado de Rio Grande do Norte (UERN), em aparelho da marca SHIMADZU, constituído de duas bombas de alta pressão, modelo LC-10Atvp, detector com arranjo de dióxido e um forno termostático para acomodação da coluna. Para as corridas utilizou-se uma coluna semi-preparativa Supercosil (LC, 250 x 10 mm, 5 µm) e como fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e isopropanol com grau HPLC, que foram filtrados em membrana de nylon com poros de PTFE de 0,45 µm e desgaseificados com gás Hélio por aproximadamente 10 min. As amostras foram dissolvidas com os solventes usados na fase móvel e filtradas num sistema manual de membrana de teflon 0,45 µm da Whatman.

4.2 - Métodos Físicos

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

4.2.1 – Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de Microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 3 °C/min e não foram corrigidos.

4.2.2 – Espectrometria de Massa

Os espectros de massas dos óleos essenciais e dos constituintes não voláteis foram obtidos em Espectrômetro de Massa SHIMADZU GC-17A acoplado a cromatógrafo Gás-Líquido modelo, QP5050, provido de coluna capilar OV-5 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, utilizando um gradiente de aumento de

temperatura de 4 °C/min de 40 °C-180 °C e 20 °C/min de 180 °C -250 °C, sendo a temperatura do injetor e do detector de 250 °C e 280 °C, respectivamente. Como fase móvel foi usado gás hélio. A análise CG/DIC foi efetuada num cromatógrafo Thermo Electron Corporation, modelo TRACE GC ULTRA, equipado com detector de ionização de chama (DIC), provido de coluna capilar apolar OV-5 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, com uma velocidade constante de 1 mL/min do fluxo do gás de arraste (hélio) e utilizando uma razão de aquecimento do injetor de 4 °C/min de 40 °C-180 °C e 20 °C/min de 180-280 °C. A temperatura usada no injetor foi de 250 °C e a do detector de 280 °C.

Os espectros de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa com ionização por *electronspray* (EM-IES). Estes espectros foram registrados num espectrômetro quadrupolo com analisador de tempo-de-vôo (UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa da USP/Ribeirão Preto, sendo os scans adquiridos no modo positivo. Condições: voltagens do end plate 3500V e do capilar 4000V, temperatura e fluxo de gás seco: 150°C e 150µL/h. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador, bem como CF₃CO₂Na e HCO₂Na foram empregados como padrão de calibração interna e externa, respectivamente.

4.2.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono 13 (RMN ¹³C), uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13, ambos pertencente ao Centro Nordeste de aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade federal do ceará (CERAUREMN-UFC) .

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl₃), metanol (CD₃OD) e piridina (C₅D₅N). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ¹H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ_H, 7,27), metanol (δ_H, 4,87; 3,31) e piridina (δ_H, 8,74; 7,58; 7,22) e para os espectros de RMN ¹³C pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio δ (77,23), metanol δ (49,15) e piridina δ (123,87; 135,91 e 150,35).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo) d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dublto largo), dt (dubleto triplo), td (tripleto duplo), t (tripleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

4.2.4 – Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros na região de absorção do infravermelho, foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, utilizando-se pastilhas de cloreto de sódio (NaCl) ou de brometo de potássio (KBr).

4.2.5 – Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em Polarímetro digital da Perkin- Elmer 341 à temperatura de 25 °C e concentração de 1 mg/2 mL de solvente.

4.2.6 – Índice de refração

Os índices de refração foram obtidos utilizando um Abbe Refractometer da QUIMIX, modelo WyA-15.

4.3 - Estudo dos Constituintes Químicos Voláteis das Folhas de *Croton regelianus*

4.3.1 - Material vegetal

As folhas de *C. regelianus* foram coletadas durante o estágio de floração nas localidades de Viçosa e Garapa-CE em julho de 2006, pelo professor Edilberto Rocha Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade federal do Ceará.

A identificação da planta foi realizada pelo professor Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e

confirmada pelo professor Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da planta encontra-se depositado no Herbário Prisco Bezerra (EAC) daquele Departamento, sob o número de registro 24460.

4.3.2 – Método de análise

O estudo dos constituintes voláteis de *C. regelianus* restringiu-se a análise do óleo essencial das folhas coletadas em Viçosa (óleo A) e Garapa (óleo B). A obtenção dos óleos foi realizada por hidrodestilação, em aparelho doseador tipo Clevenger.

As análises qualitativa e quantitativa dos componentes voláteis foram realizadas por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) e cromatografia gás-líquido acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC), respectivamente.

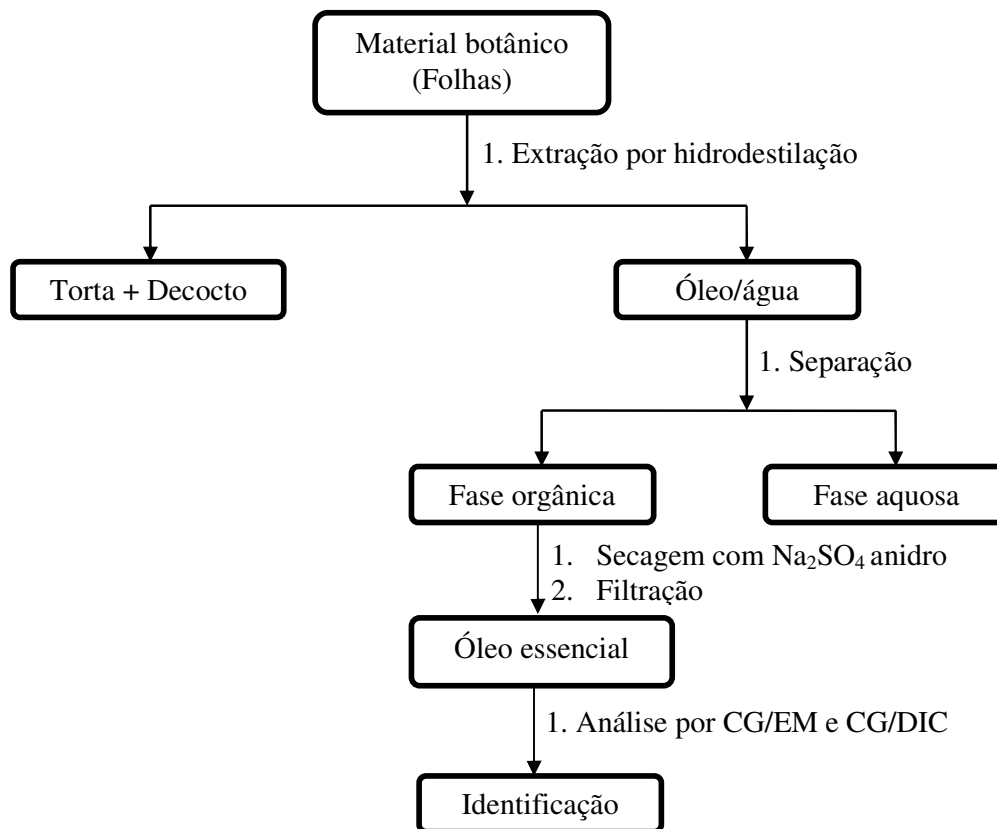
A identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais foi efetuada através da determinação do índice de Kovat corrigido, utilizando o programa computacional OriginLab, pesquisa em espectroteca e comparação com dados da literatura (Adams, 2001). Os resultados relativos à composição química dos óleos encontram-se dispostos na Tabela 9 (pág. 25).

4.3.3 – Obtenção dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*

As amostras de folhas frescas (700 g, óleo A) e (720 g, óleo B) recém coletadas foram acondicionadas em balão de 5,0 L, juntamente com 2 L de água destilada. Ao balão foi acoplado um doseador do tipo Cleavenger e um condensador, e o sistema foi então submetido ao processo de hidrodestilação por 2 hs. Após este período, a fase orgânica foi separada do hidrolato, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e filtrada, resultando em óleos amarelados, fluidos e aromáticos. Na Tabela a seguir encontram-se os dados sobre os óleos essenciais obtidos de *C. regelianus*.

Tabela 26 - Extração dos óleos essenciais A e B das folhas de *C. regelianus*

Local	Sigla	Folhas	Óleo Essencial		
			Volume (mL)	Massa (mg)	Teor % (p/v)
Viçosa	OEFCR-A	700 g	7,4	5,87	1,05
Garapa	OEFCR-B	720 g	3,5	2,48	0,49

Fluxograma 1 – Método de extração dos óleos essenciais estudados

4.3.4 – Fracionamento cromatográfico de OEF-CR-B e isolamento de CRB-1

Uma alíquota (1,5 g) do óleo essencial B foi acondicionada sobre 25 g de gel de sílica em coluna de 2,5 cm de diâmetro interno, e cromatografada utilizando-se os solventes n-pentano, CHCl_3 e AcOEt, conforme descrito na Tabela 27 (pág. 122). As 62 frações coletadas de aproximadamente 5 mL, foram agrupadas através de análise em CCD com base na semelhança de Rfs. A fração 14-27 forneceu 420 mg de uma substância pura, denominada CRB-1. A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os da literatura permitiu caracterizar CRB-1 como sendo o ascaridol, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 33.

Tabela 27 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico do óleo essencial (óleo B) das folhas de *C. regelianus*

Eluente	Concentração	Fração
n-pentano	100%	1*
n-pentano/CHCl ₃	10%	2*
n-pentano/CHCl ₃	20%	3-7
n-pentano/CHCl ₃	30%	8-12
n-pentano/CHCl ₃	40%	12-21
n-pentano/CHCl ₃	50%	22-31
n-pentano/CHCl ₃	60%	32-50
n-pentano/CHCl ₃	80%	51-55
CHCl ₃	100%	56-60
AcOEt	100%	61-62

* Frações coletadas com volume de 50mL

4.4 - Estudo dos Constituintes Fixos de *C. regelianus*

4.4.1 – Preparação dos extratos

Serragens das folhas (700g), talos (1.700 g) e raízes (500 g), obtidas após secagem a temperatura ambiente e trituração, foram individualmente extraídos através de maceração com hexano seguido de etanol (Fluxograma 2, pág. 117). As massas obtidas para cada extrato, após concentração das soluções, a pressão reduzida, estão sumarizadas na Tabela 28 (pág. 123).

Fluxograma 2 – Rota esquemática para obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas, talos e raízes de *C. regelianus*

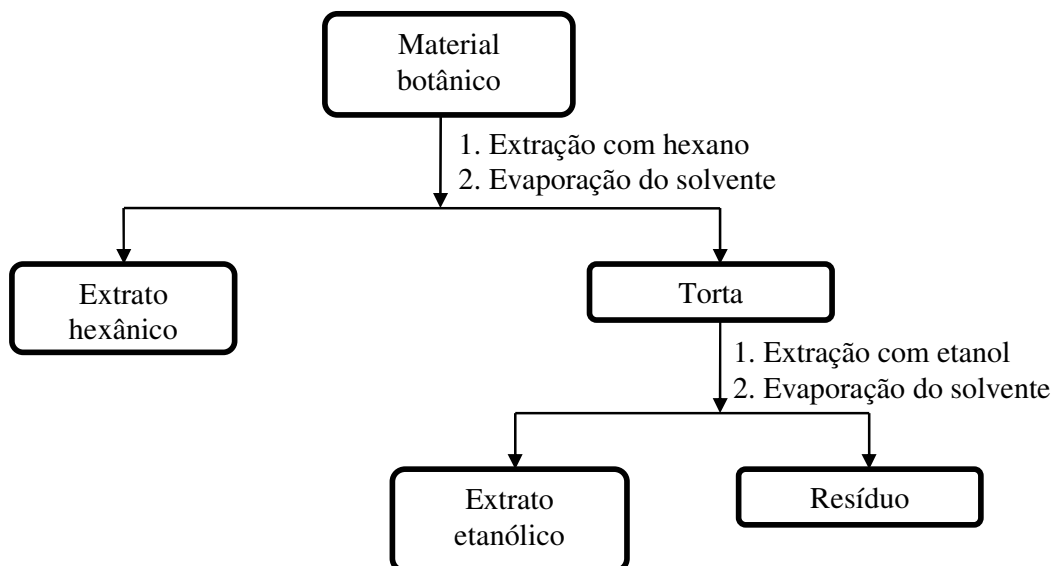


Tabela 28 - Dados referentes aos extratos das folhas, talos e raízes de *C. regelianus*

Extrato	Sigla	Peso (g)	Rend. (%)*
Hexânico das folhas	CRFH	13,7	1,96
Etanólico das folhas	CRFE	40,1	5,73
Hexânico dos talos	CRTH	10,4	0,61
Etanólico dos talos	CRTE	53,1	3,12
Hexânico das raízes	CRRH	1,5	0,30
Etanólico das raízes	CRRE	15,0	3,00

* Rendimento baseado no peso do material seco

4.4.3 – Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus* (CRFH)

O extrato CRFH (13,7 g) foi misturado a 29,8 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e disposto sobre 52,8 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 6,0 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, fornecendo as frações descritas na Tabela 29 (pág. 124).

Tabela 29 – Dados referentes ao fracionamento preliminar do extrato hexânico das folhas (CRFH)

Eluente	Fração	Peso (g)
Hexano	CRFH-H	2,0
DCM	CRFH-D	7,6
AcOEt	CRFH-A	2,8
MeOH	CRFH-M	0,2
TOTAL		12,6

4.4.3.1 – Fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂ (CRFH-D)

7,5 g da fração CRFH-D foram misturadas a 15,9 g de gel de sílica, pulverizados em gral de porcelana e cromatografados sobre 30,8 g de gel de sílica em coluna de 250 mL e 5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada empregando os solventes: éter de petróleo, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 35 frações de aproximadamente 30 mL, as quais foram concentradas sob pressão reduzida e agrupadas após análise em CCD de acordo com a Tabela 30. Com exceção das frações CRFH-D2 (2-3) e CRFH-D3 (4-7), que apresentaram em CCD manchas definidas, as demais frações não foram trabalhadas.

Tabela 30– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂ (CRFH-D)

Eluente	Fração (30 mL)	Peso (g)
Éter de petróleo/ EcOEt 20%	CRFH-D1 (1-2)	1,7
Éter de petróleo/ EcOEt 20%	CRFH-D2 (3-4)	3,1
Éter de petróleo/ EcOEt 20%	CRFH-D3 (5-7)	1,3
Éter de petróleo/ EcOEt 20%	CRFH-D4 (8-9)	0,3
Éter de petróleo/ EcOEt 40%	CRFH-D5 (10-22)	0,8
Éter de petróleo/ EcOEt 60%	CRFH-D6 (23-32)	0,2
MeOH 100%	CRFH-D7 (33-35)	0,1
TOTAL		7,5

4.4.3.2 – Fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D2 e isolamento de CRFH-1 e CRFH-2

A fração denominada CRFH-D2 (3-4), 3,1 g, foi misturada a 5,5 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e disposta sobre 69,2 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 5,0 cm de diâmetro interno. Fracionamento cromatográfico em coluna flash por eluição com a mistura binária dos solventes hexano/DCM 50%, seguida por adição de DCM e MeOH, forneceu 146 subfrações com aproximadamente 10 mL cada. Estas foram agrupadas após análise em CCD (Tabela 31).

Tabela 31 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D2

Eluente	Fração (10ml)	Peso (g)
Hexano/DCM 50%	1-9	0,0
Hexano/DCM 50%	10-24	0,1
Hexano/DCM 50%	25-37	0,1
Hexano/DCM 50%	38-44	0,1
Hexano/DCM 50%	45-72	0,4*
Hexano/DCM 50%	73-110	0,3**
DCM 100%	111-133	0,2
DCM 100%	134-143	0,3
MeOH 100%	144-145	1,4
TOTAL		2,9

* Frações contendo um sólido branco denominado CRFH-1
 ** Frações contendo um material sólido mais polar que CRFH-1

Da eluição com hexano/DCM 50%, observou-se nas frações 45-72 (424,0 mg) um sólido branco, que após adição de hexano e filtração, forneceu 80,8 mg de um material, que por sua vez foi recromatografado em coluna flash. Este material foi misturado a 162,1 mg de gel de sílica, pulverizado e acomodado sobre 42,2 g de gel de sílica em coluna de 250 mL e 2,5 cm de diâmetro interno. Como eluente utilizou-se uma mistura binária dos solventes hexano/DCM 50%, seguido por adição de MeOH, obtendo-se 51 frações com aproximadamente 7 mL cada, que foram reunidas conforme descrito na Tabela 32. A fração 17-23 (49,6 mg) constituída de um material sólido de cor branca, com ponto de

fusão na faixa de 81,2-82,4 °C foi codificado por CRFH-1. A caracterização deste composto encontra-se discutida na pág. 113.

A fração 73-110 (270,0 mg) contendo um material mais polar que CRFH-1, após sucessivas colunas cromatográficas do tipo flash usando como eluentes misturas binárias dos solventes hexano e AcOEt, culminou no isolamento de uma substância (16,9 mg), denominada CRFH-2, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 40.

Tabela 32 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração 45-72

Eluente	Fração	Peso (mg)
Hexano/DCM 50%	1-15	1,7
Hexano/DCM 50%	16	1,7
Hexano/DCM 50%	17-23	49,6*
Hexano/DCM 50%	24-37	7,3
Hexano/DCM 50%	38-50	3,6
MeOH 100%	51	11,0
RENDIMENTO %	TOTAL	74,9

*Frações contendo a substância CRFH-1

4.4.3.3 – Fracionamento cromatográfico de CRFH-D3 e isolamento de CRFH-3

A fração CRFH-D3 (1,3 g), obtida do fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂ (pág. 82), foi misturada a 1,4 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 79,5 g de gel de sílica em coluna flash de 500 mL e 4,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada isocraticamente com uma mistura binária dos solventes hexano/AcOEt 10%, seguida por adição de MeOH. Foram coletadas 89 frações de aproximadamente 10 mL cada, que após análise em CCD, foram agrupadas conforme descrito na Tabela 33 (pág.127).

Observou-se nas frações 38-45 a presença de cristais em forma de agulhas. Estas frações após monitoramento em CCD, foram reunidas e purificadas por adição de hexano e filtração, obtendo-se 143,7 mg de um material cristalino na forma de agulhas, com ponto de fusão na faixa de 124,9-126,1°C. Este material foi codificado de CRFH-3 e sua elucidação estrutural encontra-se discutida na pág. 92.

Tabela 33 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRFH-D3

Eluente	Fração (10 mL)	Peso (mg)
Hexano/AcOEt 10%	1-19	7,3
Hexano/AcOEt 10%	20-37	50,6
Hexano/AcOEt 10%	38-43	311,9*
Hexano/AcOEt 10%	44-55	123,1
Hexano/AcOEt 10%	51-67	42,0
Hexano/AcOEt 10%	68-76	13,5
Hexano/AcOEt 10%	77-83	53,6
Hexano/AcOEt 10%	84-86	113,3
Hexano/AcOEt 10%	87-88	12,0
MeOH 100%	89	305,2
TOTAL		990,5

* Frações contendo substância CRFH-3

4.4.3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt proveniente do extrato hexânico das folhas (CRFH-A)

A fração AcOEt (CRFH-A; 2,7 g), foi misturada a 8,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a fracionamento cromatográfico sobre 41,9 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 6,0 cm de diâmetro interno. Os solventes utilizados foram DCM, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binária, aumentando gradativamente a polaridade, como representado na Tabela 34, a seguir.

Tabela 34 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt (CRFH-A)

Eluente	Fração	Peso (g)
DCM	CRFH-A1	0,1
DCM/AcOEt 20%	CRFH-A2	1,2
DCM/AcOEt 40%	CRFH-A3	0,6
DCM/AcOEt 60%	CRFH-A4	0,3
DCM/AcOEt 80%	CRFH-A5	0,2
AcOEt 100%	CRFH-A6	0,1
AcOEt/MeOH 20%	CRFH-A7	0,2
MeOH 100%	CRFH-A8	0,0
TOTAL		2,7

4.4.3.5 – Fracionamento cromatográfico de CRFH-A3 e isolamento de CRFH-4

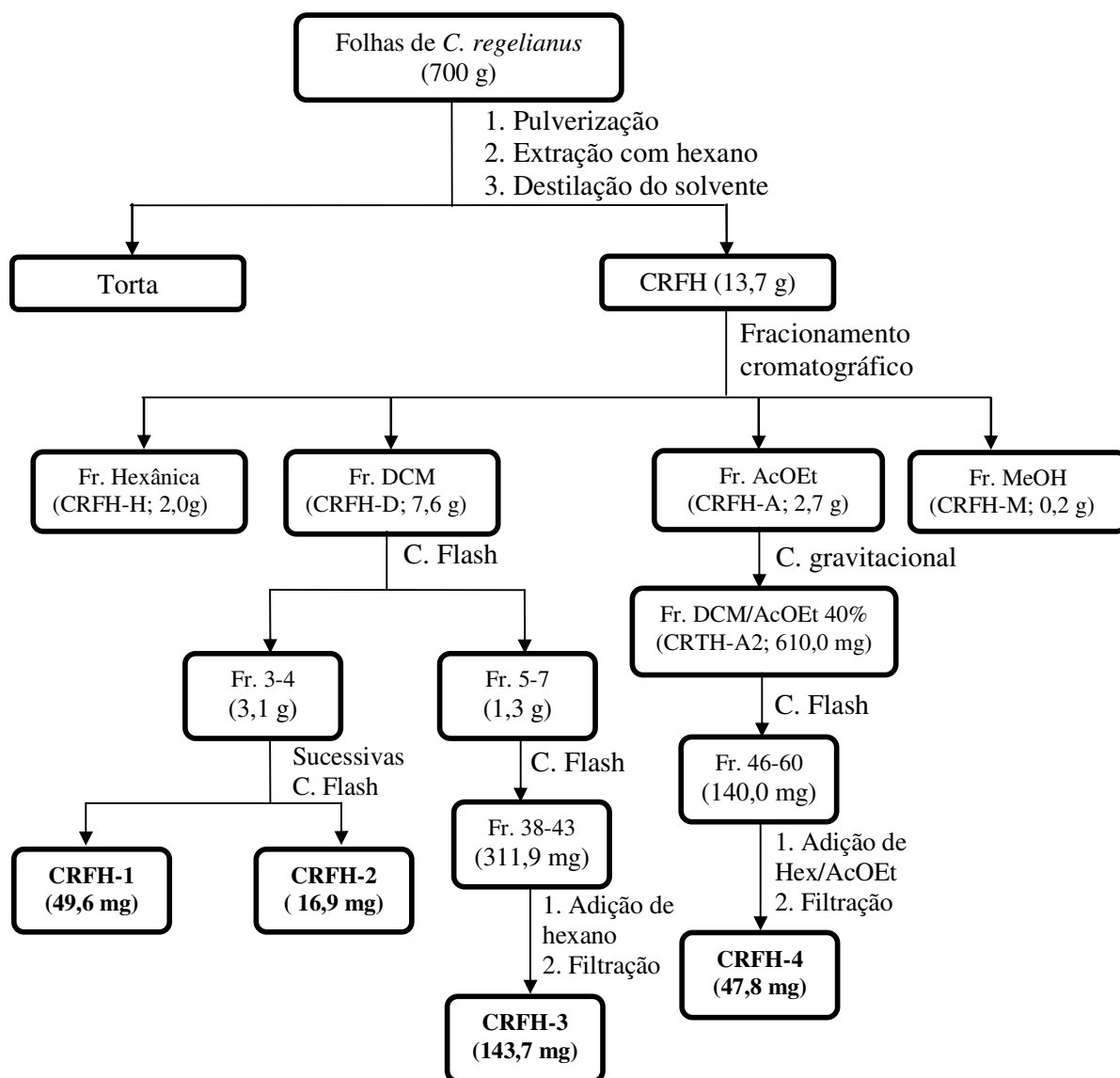
A fração CRFH-A3 (610,0 mg), foi misturada a 1,5 g de gel de sílica e cromatografada sobre 34,8 g de gel de sílica em coluna flash de 250 mL e 2,5 cm de diâmetro interno. Utilizou-se como eluente sistema de solvente DCM/AcOEt 40%, seguido por AcOEt, e MeOH. As subfrações resultantes (80 com aproximadamente 5 mL cada) foram agrupadas após análise em CCD e reunidas de acordo com semelhança de Rfs (Tabela 35, pág.128). Na fração 48-60 (140,0 mg) observou-se a formação de cristais, que após filtração e adição de hexano seguido de AcOEt, sob sonicação, forneceu 47,8 mg de um material cristalino, com ponto de fusão na faixa de 166,7 – 168,2°C, codificado por CRFH-4, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 44.

Tabela 35 – Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRFH-A3

Eluente	Fração (5 mL)	Peso (mg)
DCM/AcOEt 40%	1-28	98,6
DCM/AcOEt 40%	29-39	59,7
DCM/AcOEt 40%	40-47	52,4
DCM/AcOEt 40%	48-60	140,0*
DCM/AcOEt 40%	61-85	135,0
AcOEt/100%	86-95	68,3
MeOH 100%	96	41,9
TOTAL		595,9

* Fração contendo o material codificado por CRFH-4

Fluxograma 3 – Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRFH-1, CRFH-2, CRFH-3, e CRFH-4, obtidos a partir do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus*



4.4.4 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *C. regelianus* (CRFE)

O extrato etanólico (40,1 g) obtido das folhas de *C. regelianus* foi inicialmente dissolvido em 150 mL de uma mistura de MeOH/H₂O 30%. Após este procedimento foi submetido à partição líquido-líquido, utilizando-se os solventes hexano (5 x 50 mL), DCM (5 x 50 mL) e AcOEt (5 x 50mL), cujas massas resultantes estão descritas na Tabela 36, a seguir.

Tabela 36 - Dados referentes ao fracionamento do extrato etanólico das folhas (CRFE)

Solvente	Fração	Peso (g)
Hexano	CRFE-H	6,9
DCM	CRFE-D	10,2
AcOEt	CRFE-A	3,8
MeOH	CRFE-M	9,2
-	CRFE-I*	4,3
TOTAL		34,4

* Fração contendo material insolúvel

4.4.4.1 – Fracionamento cromatográfico da fração DCM (CRFE-D) do extrato EtOH das folhas e isolamento de CRFE-1 e CRFE-2 (Fluxograma 4, pág. 133)

Das frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato EtOH das folhas, a fração DCM foi a única que apresentou em CCD manchas definidas, justificando seu estudo. Logo a fração DCM (CRFE-D; 10,2 g) foi misturada a 19,2 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e cromatografada sobre 38,9 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 5,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada utilizando os solventes hexano, DCM, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em escala crescente de polaridade. Foram obtidas 83 frações com aproximadamente 30 mL cada, as quais foram concentradas sob pressão reduzida e agrupadas conforme sumarizada na Tabela 37 (pág. 132), após análise em CCD.

Tabela 37 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFE-D

Eluente	Fração (30 mL)	Peso (g)
Hexano/DCM 50%	1-2	0,2
Hexano/DCM 50%	3-14	0,3
Hexano/DCM 75%	15-23	0,2
Hexano/DCM 75%	24-37	0,6
DCM 100%	38-44	0,4
DCM/AcOEt 50%	45-48	1,9*
DCM/AcOEt 50%	49-60	1,1
AcOEt/100%	61-70	0,9 **
MeOH/AcOEt 25%	71-77	2,5
MeOH 100%	78-81	1,4
MeOH 100%	82-83	0,4
TOTAL		9,9

* Fração contendo material cristalino
 ** Fração contendo material sólido

Dentre as frações reunidas, destacou-se a fração 45-48 (1,9 g), a qual continha um material cristalino, esta fração foi adsorvida a 1,5 g de gel de sílica e disposto sobre 49,1 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 3,0 cm de diâmetro interno. Este material foi submetido a uma cromatografia/flash eluida isocraticamente com mistura binária dos solventes DCM/AcOEt 40%. As 72 frações coletadas, de aproximadamente 8 mL cada, foram agrupadas de acordo com a Tabela 38 (pág. 133), após analisadas por CCD. As frações 28 a 47 foram reunidas e purificadas por adição de hexano seguida de AcOEt, sob sonicação, resultando em 142,0 mg de um material cristalino, com ponto de fusão na faixa de 166,1-168,2 °C e codificado de CRFE-1. Comparação por CCD, deste material com um de mesmo aspecto isolado da fração AcOEt do extrato hexânico (CRFH-A), mostraram-se idênticos.

A fração 61-70 (910,0 mg), resultante da eluição com AcOEt 100% da coluna anterior (Tabela 38), foi reunida a 1,5 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 7,8 g de gel de sílica em coluna de 50 mL e 3,0 cm de diâmetro. A eluição foi realizado com os solventes DCM, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, de polaridade crescente. As 94 subfrações, de aproximadamente 7 mL cada, foram reunidas após monitoramento em CCD, como indicado na Tabela 39. A fração 31-

55 foi purificada após adição de AcOEt, seguido por filtração, fornecendo 16,9 mg de um sólido branco, amorfo, com ponto de fusão na faixa de 293,1-294,6 °C e codificado por CRFE-2, cuja elucidação estrutural encontra-se na pág 96.

Tabela 38 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 45-48

Eluente	Fração (8 mL)	Peso (mg)
DCM/AcOEt 40%	1-11	59,5
DCM/AcOEt 40%	12-23	304,6
DCM/AcOEt 40%	24-27	491,8
DCM/AcOEt 40%	28-47	596,0*
DCM/AcOEt 40%	48-71	526,1
MeOH 100%	72	92,6
TOTAL		1.736,1

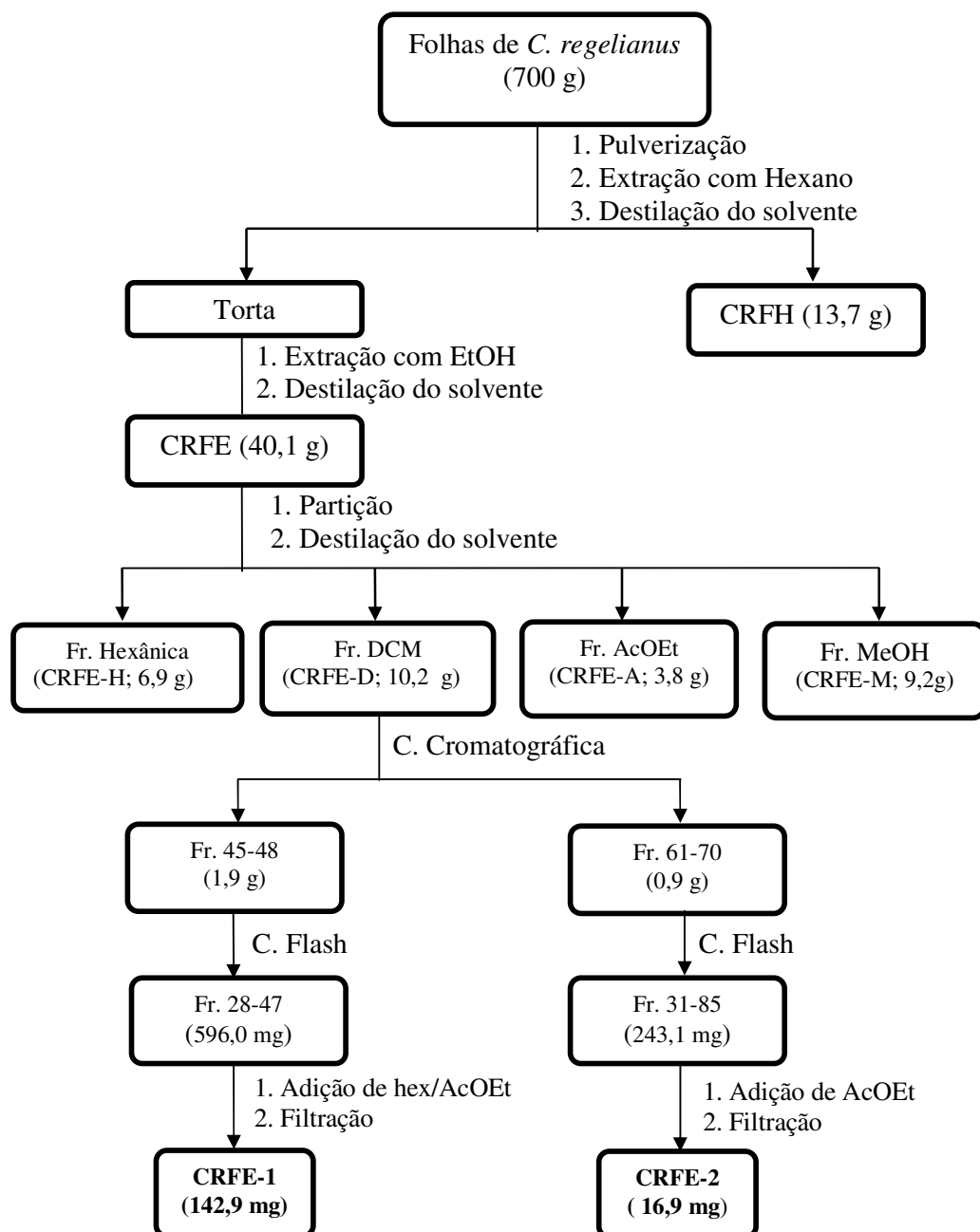
* Fração contendo a substancia CRFE-1

Tabela 39 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 61-70

Eluente	Fração (8mL)	Peso (mg)
DCM/AcOEt 50%	1-6	42,3
DCM/AcOEt 50%	7-13	60,8
DCM/AcOEt 50%	14-17	46,7
DCM/AcOEt 60%	18-30	274,5
DCM/AcOEt 70%	31-55	243,1*
DCM/AcOEt 70%	56-65	38,0
AcOEt 100%	66-93	49,9
AcOEt/MeOH 50%	94	79,9
TOTAL		835,2

* Fração contendo a substancia CRFE-2

Fluxograma 4 – Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRFE-1 e CRFE-2, obtidos a partir do extrato etanólico das folhas de *C. regelianus*



4.4.5 – Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus* (CRTH)

O extrato hexânico dos talos (CRTH, 9,9 g) foi misturado a 18,9 g de gel de sílica e cromatografado sobre 44,6 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 6,0 cm de diâmetro interno. O fracionamento foi realizado com a série de eluentes: hexano/DCM 20%, DCM, AcOEt e AcOEt/MeOH 50%, cujas frações resultantes encontram-se descritas na Tabela 40, a seguir.

Tabela 40 – Dados referentes ao fracionamento preliminar do extrato hexânico dos talos (CRTH)

Eluente	Fração	Peso (g)
Hexano/DCM 20%	CRFH-HD	1,2
DCM 100%	CRFH-D	2,7
AcOEt 100%	CRFH-A	4,4
AcOEt/MeOH 50%	CRFH-AM	0,8
TOTAL		9,1

4.4.5.1 – Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos (CRTH-A)

A fração AcOEt (CRTH-A, 4,4 g), ativa contra várias linhagens de células tumorais humanas, foi misturada com 9,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana, acondicionada sobre 54,5 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 6,5 cm de diâmetro interno e submetida a eluições sucessivas com os solventes DCM, AcOEt e MeOH, puros ou/em misturas de polaridade crescente. Após destilação do solvente à pressão reduzida, obteve-se as frações conforme descrito na Tabela 41 (pág. 136). Com a finalidade de biomonitorar o estudo químico todas as frações obtidas foram submetidas à avaliação da atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humana.

Tabela 41 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt (CRTH-A)

Eluente	Fração	Peso (g)
DCM	CRTH-A1	0,1
DCM/AcOEt 20%	CRTH-A2*	1,6
DCM/AcOEt 40%	CRTH-A3*	0,5
DCM/AcOEt 60%	CRTH-A4*	0,6
DCM/AcOEt 80%	CRTH-A5	0,3
AcOEt 100%	CRTH-A6	0,2
AcOEt/MeOH 20%	CRTH-A7	0,5
MeOH 100%	CRTH-A8	0,1
TOTAL		3,9

* Frações ativas

4.4.5.2 – Fracionamento cromatográfico de CRTH-A2 e isolamento de CRTH-3 e CRTH-4 (Fluxograma 5, pág. 138)

A fração DCM/AcOEt 20% (CRTH-A2; 1,5 g) foi misturada à 2,4 g de gel de sílica e acondicionado sobre 25,4 g de gel de sílica em coluna de 125 mL e 2,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes hexano, isopronanol e metanol, puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade. As 53 frações (de aproximadamente 8 mL cada) foram agrupadas após análise em CCD, conforme descrito na Tabela 42 (pág. 137).

Todas as frações obtidas da coluna acima foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE). Em função da quantidade de material e do número de substâncias presentes nos cromatogramas, apenas as frações 6-8 e 14-20 foram trabalhadas.

A fração 6-8 (362,3 mg) foi inicialmente solubilizada em 2 mL de uma mistura dos solventes grau HPLC hexano /AcOEt 5% e filtrada num sistema manual com filtros de 0,45 µm. O melhor método foi verificado através da utilização de uma coluna semi-preparativa Supercosil (LC, 250x10 mm, 5 µm) e com o sistema de eluente hexano /AcOEt (75:25 v/v) num fluxo de 2 mL/min, usando um loop de 100 µL. Após injeção de todo material, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 6,9 mg de material, codificado por CRTH-3 (Figura 103, pág. 138).

Para a fração 14-20 (218,5 mg) foi utilizado as mesmas condições descritas para fração 6-8, com modificação apenas no sistema de eluição, hexano/isopropanol (92:8 v/v). Antes da corrida cromatográfica semi-preparativa, o material foi solubilizado em 3 mL do sistema de solvente e filtrado manualmente em filtros de 0,45 μ m. Ao término das injeções, o solvente foi removido sob pressão reduzida, fornecendo 6,8 mg de um material, codificado por CRTH-4 (Figura 104, pág. 138).

Tabela 42 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CRTH-A2

Eluente	Fração (8 mL)	Peso (mg)
Hexano/IpOH 10%	1	-
Hexano/IpOH 10%	2-3	24,7
Hexano/IpOH 10%	4-5	97,5
Hexano/IpOH 10%	6-8	362,3*
Hexano/IpOH 10%	9	84,3
Hexano/IpOH 10%	10-13	205,1
Hexano/IpOH 10%	14-20	218,5*
Hexano/IpOH 10%	21-29	97,9
Hexano/IpOH 10%	30-40	64,5
Hexano/IpOH 50%	41-44	72,5
Hexano/IpOH 50%	45-52	23,1
MeOH 100%	53	70,9
TOTAL		1.426,3
*Frações trabalhadas no CLAE		

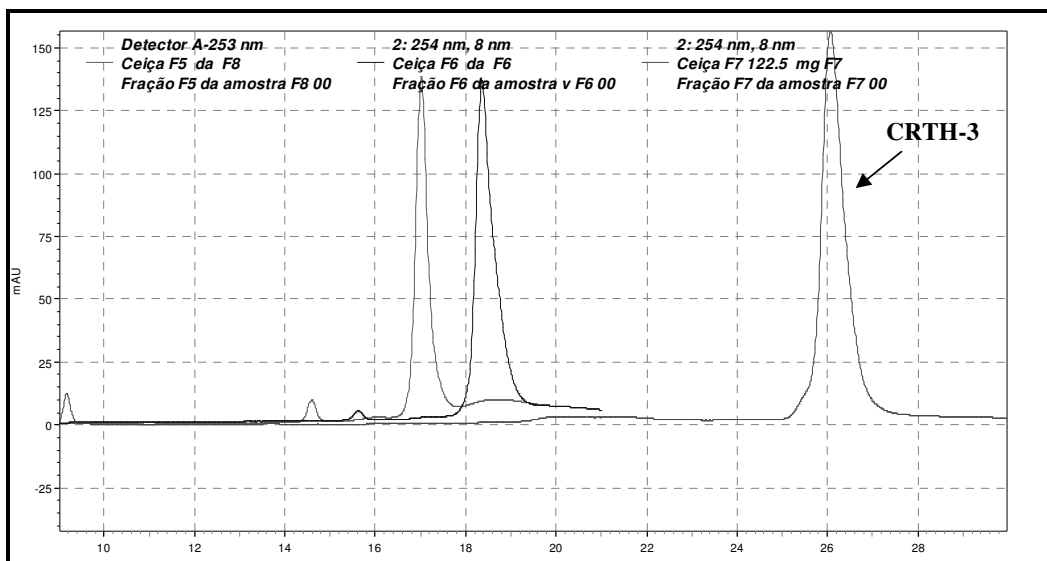


Figura 103- Cromatograma da substância CRTH-3

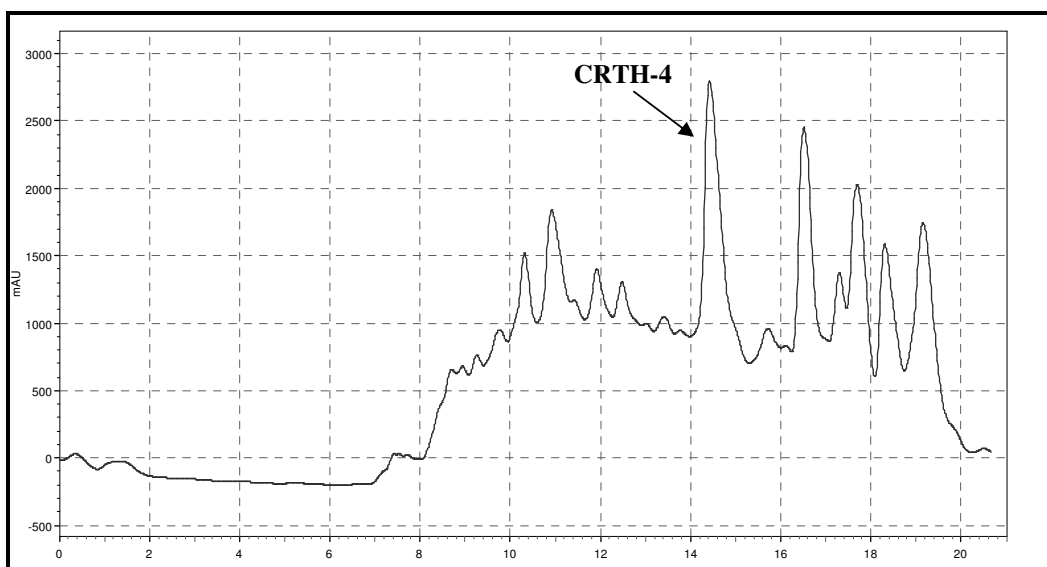
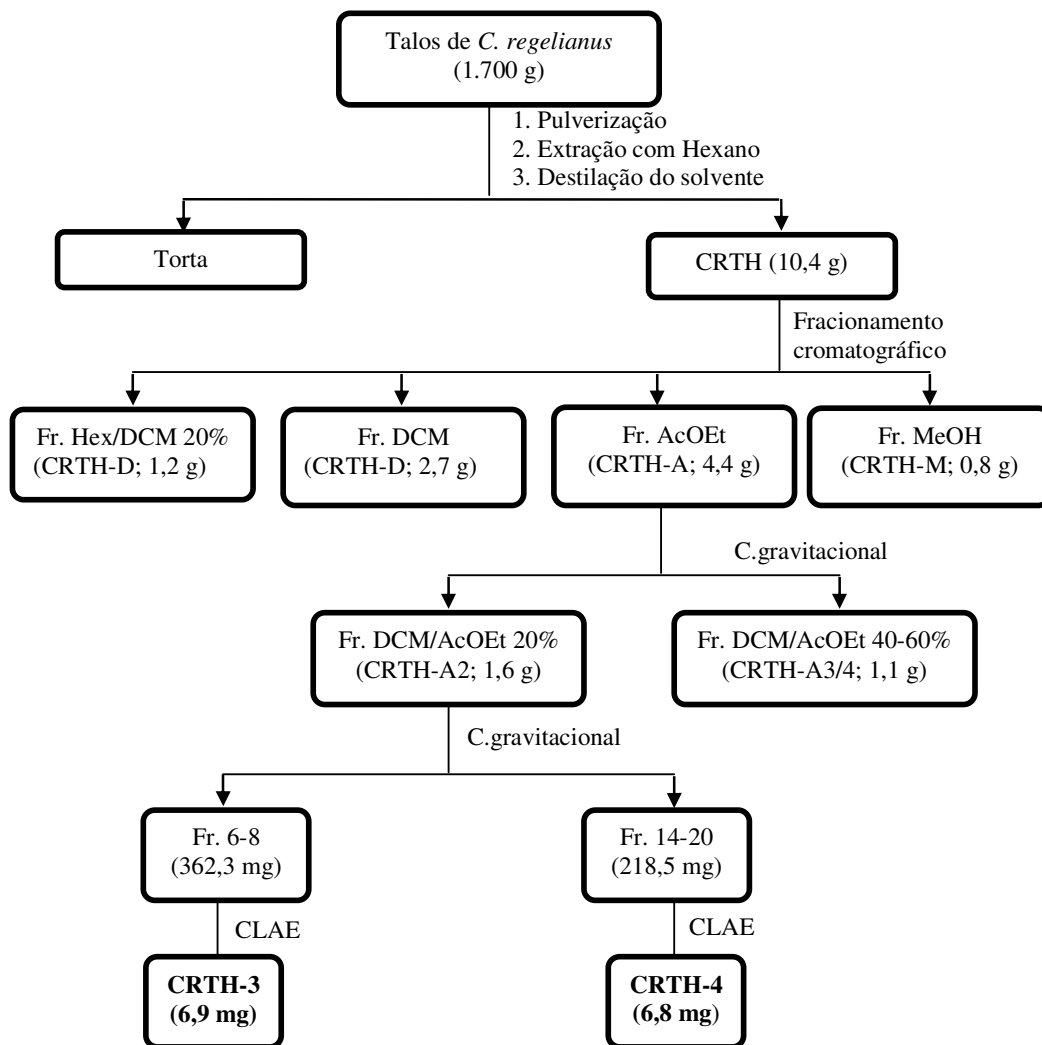


Figura 104 - Cromatograma da substância CRTH-4

Fluxograma 5 – Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRTH-3 e CRTH-4, obtidos a partir do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus*



4.4.6 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos talos de *C. regelianus* (CRTE)

O extrato etanólico (53,1g) obtido dos talos de *C. regelianus* foi dissolvido em 100 mL de uma mistura de MeOH/H₂O 20% e submetido à partição líquido-líquido, utilizando-se os solventes DCM (5 x 50 mL) e AcOEt (5 x 50mL), cujas massas estão descritas na Tabela 43, a seguir.

Tabela 43 - Dados referentes ao fracionamento do extrato etanólico dos talos (CRTE)

Solvente	Fração	Peso (g)
DCM	CRTE-D	18,1
AcOEt	CRTE-A	4,9
MeOH/H ₂ O 20%	CRTE-M	26,0
TOTAL		49,0

* Fração contendo material insolúvel

4.4.6.1 – Fracionamento cromatográfico da fração CRTE-D e isolamento de CRTE-1 e CRTE-2 (Fluxograma 6, pág. 137)

A fração CRTE-D (18,1 g), a qual apresentou manchas definidas em CCD, foi misturada a 26,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e cromatografada sobre 49,8 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 6,0 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se as frações sumarizadas na Tabela 44 (pág.141).

Após análise em CCD, as frações 3 e 4 foram reunidas, resultando em 2,1 g de material, que por sua vez foi submetido a um fracionamento cromatográfico em coluna flash. Os 2,1 g de material foram misturados a 5,3 g de gel de sílica, cromatografada sobre 39,5 g de gel de sílica em coluna de 500 mL e 4 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada inicialmente com uma mistura binária dos solventes hexano/AcOEt 60%, seguido pela adição de AcOEt 100% e MeOH/AcOEt 50%. As frações resultantes (75 de aproximadamente 10 mL cada) foram agrupadas conforme descrito na Tabela 45 (pág. 141), após análise por CCD.

Tabela 44 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CRFE-D

Eluente	Fração (300 mL)	Peso (g)
Hexano/AcOEt 20%	1	2,3
Hexano/AcOEt 40%	2	2,4
Hexano/AcOEt 60%	3	0,7
Hexano/AcOEt 80%	4	1,4
AcOEt 100%	5	2,9
AcOEt/MeOH 20%	6	6,0
MeOH 100%	7	1,8
TOTAL		17,8
* Frações reunidas		

Tabela 45 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 3-4

Eluente	Fração (10 mL)	Peso (g)
Hexano/AcOEt 60%	1-5	0,0
Hexano/AcOEt 60%	4-9	0,1
Hexano/AcOEt 60%	10-15	0,2
Hexano/AcOEt 60%	16-31	0,6
Hexano/AcOEt 60%	32-73	0,8*
AcOEt 100%	74	0,2
AcOEt/MeOH 50%	75	0,1
TOTAL		2,0
* Fração contendo um material sólido		

Entre as frações reunidas, a de número 32-73 (750,0 mg) apresentou um material sólido. Esta fração foi então adsorvida a 1,3 g de gel de sílica e disposto sobre 23,1 g de gel de sílica em coluna de 250 mL e 2,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada sob média pressão utilizando uma mistura binária dos solventes DCM/AcOEt 40%, seguido por adição de AcOEt 100% e MeOH/AcOEt 50%. Foram coletadas 99 frações, com aproximadamente 8 mL cada, estas frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme Tabela 46 (pág.142).

As frações de 13 a 20 foram reunidas e purificadas com a adição de uma mistura de hexano/AcOEt 50%, sob sonicação, resultando em 15,0 mg de um material cristalino,

solúvel em piridina, com ponto de fusão na faixa de 246,0-247,4 °C e codificado por CRTE-1, cuja determinação estrutural encontra-se na pág 100.

A subfração 36-47 (71,4 mg), foi misturada a 364,9 mg de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 2,3 g de gel de sílica em coluna de 150 mL e 1,5 cm de diâmetro. A eluição foi realizada com uma mistura binária dos solventes DCM/AcOEt 50%, seguido por adição de AcOEt. Foram coletadas 30 subfrações com aproximadamente 4 mL cada. As frações 10-15, após comparação em CCD, foram reunidas resultando em 12,2 mg (Tabela 47) de um sólido cristalino, codificado por CRTE-2, cuja determinação estrutural encontra-se na pág. 67.

Tabela 46– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 32-73

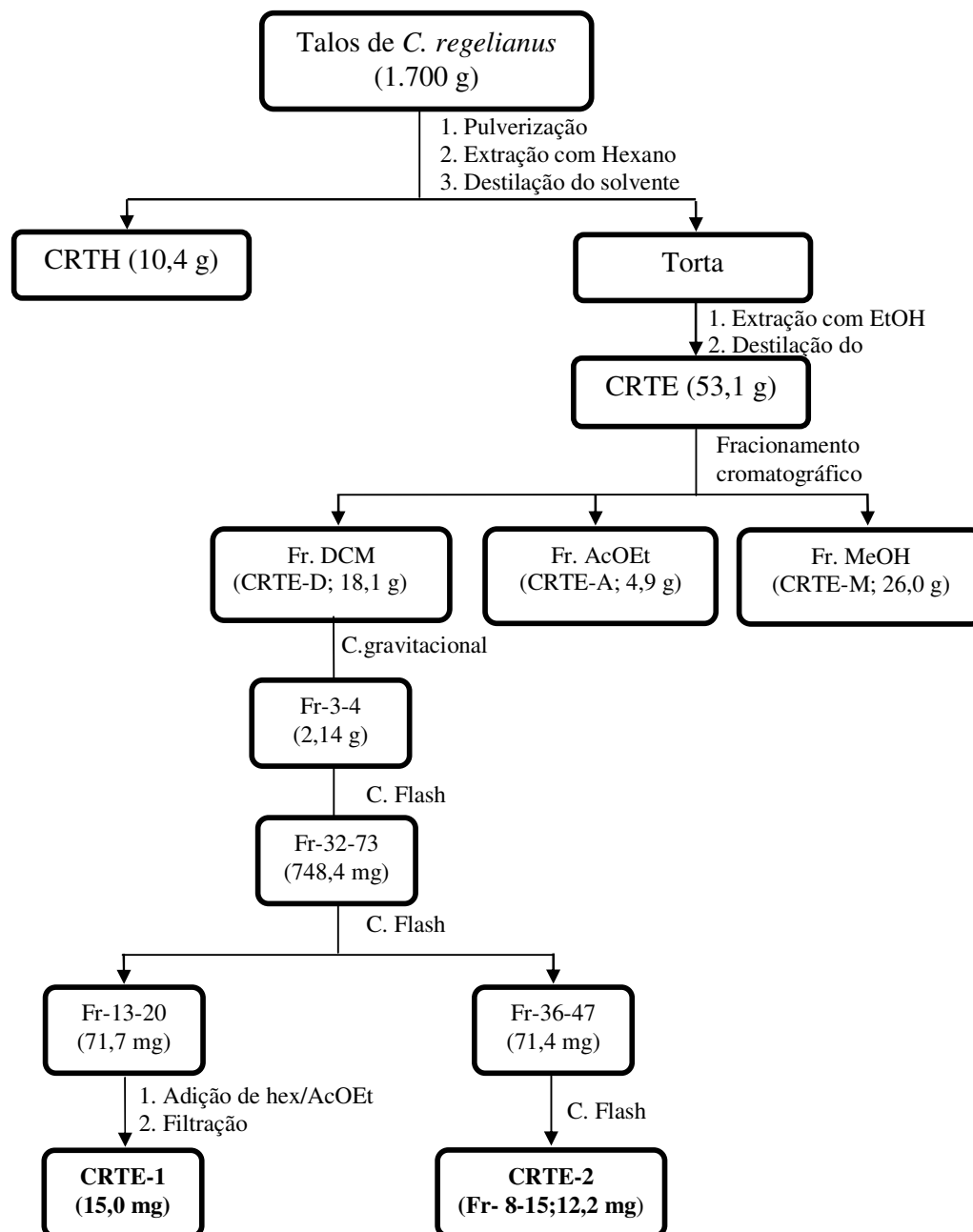
Eluente	Fração (10 mL)	Peso (mg)
DCM/AcOEt 40%	1-12	60,9
DCM/AcOEt 40%	13-20	71,7*
DCM/AcOEt 40%	21-35	77,7
DCM/AcOEt 40%	36-47	71,4**
DCM/AcOEt 40%	48-97	180,4
AcOEt 100%	98	53,4
AcOEt/MeOH 50%	99	188,6
TOTAL		704,1

* Fração contendo CRTE-1
 ** Fração contendo CRTE-2

Tabela 47– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração 36-47

Eluente	Fração (4 mL)	Peso (mg)
DCM/AcOEt 50%	1-7	13,6
DCM/AcOEt 50%	8-9	17,1
DCM/AcOEt 50%	10-15	12,2
DCM/AcOEt 50%	16-30	5,4
AcOEt 100%	31	4,4
TOTAL		50,1

Fluxograma 6 – Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos CRTE-1 e CRTE-2, obtidos a partir do extrato etanólico dos talos de *C. regelianus*



4.5 - Modificação estrutural do composto CRTE-2

4.5.1 - Reação de acetilação de CRTE-2

6 mg de CRTE-2 foi adicionado 0,3 mL de piridina e em seguida 0,6 mL de anidrido acético. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por um período de 12 horas. Ao término da reação, a qual foi monitorada por CCD, a mesma foi neutralizada por adição de 10 mL de uma solução de HCl 10%. O material foi transferido para um funil de separação de 50 mL e extraído com CHCl_3 (4 x 5 mL). O produto foi então seco com Na_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo até sua secura, fornecendo 6,6 mg de um material sólido amorfo, denominado CRTE-2Ac, cuja determinação estrutural encontra-se na pág. 77.

Capítulo 5

Estudo do Potencial Biológico de C. regelianus

5 - ESTUDO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *C. REGELIANUS*

O interesse pela avaliação do potencial farmacológico e biológico de *C. regelianus* surgiu a partir de informações de seu uso etnofarmacológico no tratamento de diversas doenças, tais como reumatismo, doenças do estômago e no tratamento de tumores malignos (Matos, 1999; Moraes *et al.*, 1997). Bem como, o fato do efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. regelianus* ter sido comprovado cientificamente, por Moraes *et al.* (1997), em uma avaliação do potencial antitumoral de extratos de plantas nativas do nordeste do Brasil.

Outro ponto importante levado em consideração foi o fato do gênero ser uma rica fonte de compostos bioativos, (Bacelli *et al.*, 2005; Eisenreich *et al.*, 2003 e Neergheen, *et al.*, 2007) e de óleos essenciais com um largo espectro de atividades biológicas, incluindo efeito cardiovascular, antiespasmódico, anticâncer, antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo e larvicida, (Bezerra *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2004; Sylvestre *et al.*, 2006; Alviano *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005 e Morais *et al.*, 2006).

5.1 – Avaliação do potencial larvicida e nematicida dos óleos essenciais de *C. regelianus*

5.1.1 – Considerações sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita*

Diversas espécies de fitonematóides têm sido identificadas associadas às raízes e ao solo da rizosfera de plantas. As espécies *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* e *Meloidogyne* spp., com destaque para *M. incognita* e *M. javanica*, são tidas como as de maior importância (Boas, *et al.*, 2002). Em geral, os danos provocados pelos fitonematóides em cultivos agrônômicos são diretamente proporcionais ao aumento de suas populações, ocorrendo redução do tamanho e peso dos frutos, atraso na maturação e morte das plantas. As estimativas de perdas causadas por *Meloidogyne* spp., em diferentes culturas no Brasil, são em média de 12,69%, (Boas, *et al.*, 2002). Entre as espécies de *Meloidogyne*, *M. incognita* e *M. javanica*, são as que ocorrem com maior frequência em todos os estados brasileiros, com infestações mais expressivas nos Estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo, devendo-se tal dispersão à comercialização indiscriminada de mudas infestadas ou pela introdução do parasita nas áreas, através de outras plantas hospedeiras .

Entre os problemas associados ao método convencional de controle de fitonematóides na agricultura, o controle químico apresenta vários inconvenientes, como o alto custo dos produtos, a presença de resíduos inseticida nos frutos, intoxicação pela exposição aos produtos, contaminações de fontes de água e destruição da microflora do solo (Boas, *et al.*, 2002). Diante do exposto, óleos essenciais com propriedade nematicida pode ser um método alternativo para o desenvolvimento de agente nematicidas com menos toxicidade e baixo impacto ambiental.

5.1.2 - Considerações sobre as larvas de *Artemia* sp.

Artemia sp. é um pequeno crustáceo que tem sido bastante utilizado em muitos estudos fisiológicos. Os náupilos são facilmente obtidos através da hidratação dos cistos, que passam por vários estágios larvais, antes da maturação. No primeiro estágio, náupilo I (24 h), o trato digestivo desses animais não entra em contato com o meio externo e sua alimentação consiste basicamente do vitelo do próprio ovo. Com a mudança para o estágio II (48 h), os náupilos começam a se alimentar de matéria orgânica em suspensão, através da ingestão contínua da água circulante. Nesse estágio, os náupilos mais sensíveis são freqüentemente utilizados nos testes de toxicidade. Neste ensaio, a metodologia é simples e permite a avaliação da toxicidade aguda de óleos essenciais, extratos, frações ou substâncias puras provenientes de produtos naturais. Quando o teste de toxicidade neste ensaio é positivo, há um indicativo de que o material testado poderá apresentar atividade citotóxica.

5.1.3 - Considerações sobre o mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegyptis*

A dengue, infecção viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, é considerada atualmente a mais importante arbovirose que afeta o ser humano, causando um sério problema de saúde pública no mundo. O mosquito *Aedes aegypti* é o principal inseto transmissor da dengue nos países tropicais. Nas Américas, é responsável por freqüentes epidemias e circulação dos quatro sorotipos de vírus no continente (Furtado *et al.*, 2005).

O combate ao mosquito da dengue é baseado no uso de inseticidas sintéticos ou reguladores de crescimento de insetos, que apesar de efetivos, o uso contínuo e indiscriminado tem interferido no ecossistema, pois atinge outras espécies, inclusive o homem. Além do mais, em alguns casos, tem sido observado o desenvolvimento de

resistência desse díptero aos inseticidas convencionais. Diante deste problema, há à necessidade de desenvolver novas estratégias para controlar o *A. aegypt* de forma seletiva. Diversos estudos comprovam a atividade de produtos naturais, em especial de óleos essenciais contra diferentes espécies de mosquitos, incluindo o *A. aegypt* (Chang *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2006). Os óleos essenciais constituem uma fonte rica de compostos bioativos, não tóxicos, biodegradáveis e potencialmente adequados para o uso no controle destes insetos, podendo ser uma alternativa aos agentes inseticidas usados atualmente.

Com este propósito, os óleos essenciais das folhas de *C. regelianus* e o ascaridol, constituinte majoritário isolado do óleo essencial (óleo B), foram submetidos a testes de atividade larvicida frente às larvas do *A. aegypti* no terceiro estágio e as larvas de *Artemia sp* no segundo estágio, bem como contra o fitonematoide *M. incognita*, este último, usando as larvas de juvenis no estágio 2 (J₂).

5.1.4 – Atividades larvicida e nematicida do óleo essencial e do ascaridol

Para avaliação da atividade nematicida foi utilizado ovos de *M. incognita* extraídos de raízes de *Vernonia Sp*. Esses ovos foram colocados em placa de Petri com água destilada para a eclosão dos juvenis durante 24 h. Após a eclosão, porções contendo 50 mL de água e aproximadamente 100 destes juvenis (J₂) foram colocados em vidros nematológicos, aos quais, foram acrescentadas soluções dos produtos a serem testados, até completar o volume de 1 mL. Os materiais testados foram diluídos em soluções de H₂O/DMSO 2% a uma concentração de 1 mg/mL. Os vidros nematológicos foram mantidos a temperatura média de 28 °C e as contagens dos nematóides mortos e inativos foram realizadas após 24 h. Cada tratamento foi repetido 4 vezes e um teste controle foi realizado usando água e a solução de H₂O:DMSO 2%. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Moléculas Bioativas Aplicada a Fitossanidade (*LabMol-Fito*) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sob coordenação do prof. Dr. Manoel Andrade Neto.

Para a avaliação do potencial larvicida frente à *Artemia sp.*, os cistos foram mantidos por 24 h em um becker com água do mar filtrada, sob aeração suave e iluminação intensa, até a eclosão dos náuplios I. Estas larvas foram separadas para um segundo becker e mantidas por mais 24 h para atingirem o estágio de náuplio II. O plaqueamento foi

realizado pela adição de 10 náuplios/poços, contados a olho nú, em placas com 24 poços, contendo os compostos em concentrações diferentes (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL), e em triplicata. Como controle negativo, foi utilizado água do mar filtrada e o veículo usado para diluir as substâncias, H₂O/DMSO 1%. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por 24 h. Após este período foram contadas as larvas vivas (animais em movimento) e mortos contidos em cada poço.

Para os ensaios da atividade larvicida, alíquotas de 5 a 500 mg/mL do óleo essencial foram colocadas em um becker (50 mL) e dissolvidos em H₂O:DMSO (8,5:1,5). 50 larvas do *A. aegypti*, no terceiro estágio de vida, foram distribuídas em cada becker. Após 24 h, na temperatura ambiente, o número de larvas inoperantes foi contado e posteriormente calculado a concentração letal. Como controle foi usado DMSO e água. Para cada amostra, três experimentos independentes foram realizados. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia do Núcleo de Endemias da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, sob coordenação da prof. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

5.1.5 – Resultados e Discussão

Como foi destacado anteriormente, os óleos essenciais de espécies de *Croton* são fontes potenciais de compostos bioativos. Isto nos instigou a avaliar os efeitos larvicida dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*, óleo A (Viçosa-CE) e óleo B (Garapa-CE), frente às larvas do *A. aegypti* e de *artemia* sp, bem como sua atividade nematicida contra o fitonematóide *M. incognita* (Tabela 48, pág. 148). Os valores de CL₅₀ 24,22 µg/mL (óleo B) e CL₅₀ 66,74 µg/mL (óleo A), indicam potente atividade larvicida para os óleos essenciais de *C. regelianus*, quando comparados a óleos essenciais com alto potencial larvicida, tais como os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* CL₅₀ 63 µg/mL e 69 µg/mL, respectivamente. (Cavalcante *et al.*, 2004).

Particularmente o óleo B exibiu atividade mais elevada (CL₅₀ 24,22 µg/mL), quando comparado ao óleo A (CL₅₀ 66,74 µg/mL), este resultado foi muito interessante, uma vez que ambas as amostras de óleos apresentaram composição qualitativa similar, mas quantitativamente diferente. Uma avaliação sobre os constituintes principais das duas amostras de óleo, indicou que o ascaridol, é o composto majoritário identificado no óleo B, também presente no óleo A, mas em menor quantidade. Assim, a fim de determinar o papel do ascaridol na atividade larvicida expressada pelo óleo B, este composto foi isolado e

testado. Corroborando nossas expectativas, o ascaridol mostrou uma CL_{50} de 9,60 $\mu\text{g/mL}$, indicando uma potente atividade larvicida, comparável a do β -asarone, um inseticida natural utilizado como controle (Ciccia *et al.*, 2000)

O efeito larvicida também foi avaliado usando o micro-crustáceo *Artemia* sp, que mostrou uma forte atividade, apresentando CL_{50} de 41,07 (óleo A) e 24,47 $\mu\text{g/mL}$ (óleo B). Mais uma vez o ascaridol mostrou eficácia exibindo uma CL_{50} de 9,46 $\mu\text{g/mL}$.

No ensaio nematocida o ascaridol e, particularmente o óleo essencial, mostraram atividade nematostática moderada com EC_{50} de 87,36 e 201,83 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos são bastante promissores, podendo indicar o óleo essencial do *C. regelianus* como um inseticida natural, eficaz no controle do *A. aegypti*. Diante dos resultados presume-se que o ascaridol, seja o principal responsável pela atividade larvicida expressada pelos óleos.

Tabela 48 – Dados resultantes das atividades larvicida e nematostática dos óleos essenciais de *C. regelianus* e ascaridol

	CL_{50}		EC_{50}
	($\mu\text{g/mL}$; intervalo de confiança)		($\mu\text{g/mL}$; intervalo de confiança)
	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Artemia</i> sp.	<i>Meloidogine incognita</i>
Óleo essen. (A)	66,74 (62,05 - 71,79)	41,07 (35,08 – 48,09)	-
Óleo essen. (B)	24,22 (22,44 – 26,13)	24,47 (20,71 – 28,91)	201,83 (188,83 – 215,72)
Ascaridol	9,60 (8,79 – 10,49)	9,46 (7,89 – 11,35)	87,36 (81,13 – 94,06)

A tabela apresenta os valores de CL_{50} (concentração letal de 50%) e EC_{50} (concentração efetiva de 50%) ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses) obtidos em três experimentos independentes, usando o método Spearman-Kärber

5.2 – Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial, extratos, frações e substâncias isoladas de *C. regelianus*

5.2.1 – Considerações sobre o câncer

O câncer é uma das doenças que mais causa temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Pode ser definido como um conjunto de doenças

causadas pela proliferação anormal das células, formando tumores. Atualmente, são conhecidos cerca de 200 tipos de câncer, entre os quais podemos citar o de pele, pulmão, mama, fígado, estômago, rim, ovário, cérebro, próstata, pâncreas e ossos. Segundo pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer constitui a terceira causa de óbitos no mundo, matando cerca de 6 milhões de pessoas por ano e atualmente é a segunda causa de morte no Brasil (Almeida *et al.*, 2005).

O tratamento do câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgias, radioterapia, quimioterapia ou, com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia é utilizada em tratamento sistêmico (atua em todo corpo) à base de fármacos que impedem a reprodução celular e conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Atualmente um importante alvo quimioterápico são os produtos naturais, que associados a microtúbulos, estabilizam a replicação celular, bloqueando assim o processo de divisão das células (Souza, 2004).

Tendo em vista que existem mais de 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1000 apresentam propriedades anticancer significante (Lima *et al*, 2006), estudos a partir de extratos vegetais e óleos essenciais, surgem com a expectativa de se encontrar substâncias com propriedades antineoplásicas e simultaneamente seletivas, para serem usadas em futuras formulações de fármacos para o tratamento desta doença.

5.2.2 – Atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células tumorais

Os óleos essenciais, extratos, frações e compostos isolados de *C. regelianus* foram avaliados quanto as suas propriedades citotóxicas em quatro linhagens de células tumorais (Tabela 49).

Tabela 49 - Linhagens de células utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagem	Tipo de neoplasia	Origem
HCT8	Carcinoma de cólon	Humana
MDA-MB-435	Carcinoma de mama	Humana
HL60	Leucemia	Humana
SF295	Cérebro	Humana

O método consiste na cultura de células em meio adequado, seguido da incubação da droga por 72 h (Mosmann, 1983). Transcorrido este período, é feita uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o composto azul formazan, pela atuação da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo desta maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Para quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorvâncias foram lidas com o auxílio de espectrofotômetro, no comprimento de onda de 550 nm. As amostras foram diluídas em DMSO nas concentrações de 10 mg/mL para extratos, 5 mg/mL para frações e 1mg/mL para substâncias puras (extratos e frações foram testados em concentrações únicas 50 e 25 µg/mL, respectivamente). Para substâncias puras foram realizadas curvas de concentração-resposta. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou em triplicata e a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. A interpretação dos dados obtidos pela análise espectrofotométrica foi realizada usando software Prism versão 3.0 (GraphPad Prism Software) que indica a concentração capaz de provocar 50% do efeito máximo (CL₅₀) com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%). Para concentrações únicas os experimentos foram analisados segundo suas médias de inibição.

5.2.3 – Atividade antitumoral *in vivo*

O teste da atividade antitumoral *in vivo* foi utilizado sobre o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 8 dias de implantação na região axilar esquerda de camundongos (*Mus musculus* Swiss). O animal doador ou de manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e transferido para um meio adequado para posterior contagem das células. Nos animais receptores, foram injetados 2x10⁶ céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos animais, oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. Nesse experimento, foram utilizados 8 animais por grupos, num total de 6 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram inoculados com tumor Sarcoma 180. Após 24 h de inoculação do tumor foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos. A droga 5-Fluoruracil (5-FU) (25 mg/Kg), foi usada como controle positivo. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. 24 h

após o término do tratamento, os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os rins, fígado e baço para pesagem e análise histopatológica.

5.2.4 - Investigação da atividade citotóxica do óleo essencial e de seu constituinte majoritário, o ascaridol

O óleo essencial e o ascaridol apresentaram atividade anticancer *in vitro* e *in vivo*. O efeito *in vitro* do óleo essencial e do ascaridol em diversas linhagens de células tumorais humanas encontra-se sumarizado na Tabela 50. Os valores de CL₅₀ na escala de 22,24 a 47,99 µg/mL para o óleo essencial e 6,26 a 18,41 µg/mL para o ascaridol, indicam uma significativa atividade anticancer, quando comparados a óleos essenciais considerados com forte atividade citotóxica, tais como o óleo essencial dos frutos de *Angelica uarchangelica*, com valores de CL₅₀ na ordem de 48,0 a 91,8 µg/mL (Sigurdsson *et al.*, 2005), e o óleo essencial das folhas de *Comptonia peregrina* (Sylvestre *et al.*, 2007), com valores de CL₅₀ de 46 a 66 µg/mL.

Tabela 50 – Atividade citotóxica CL₅₀ do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* e seu componente majoritário, ascaridol, em linhagens de células tumorais humanas

Linhagens celulares	5-FU CL ₅₀ (µg/mL)	Óleo essencial CL ₅₀ (µg/mL)	Ascaridol CL ₅₀ (µg/mL)
HL-60	12,59	22,24	6,26
	9,72-16,29	18,77-26,36	4,15-9,44
HCT-8	0,36	40,03	18,41
	0,18-0,71	36,99-53,38	12,67-23,74
SF295	0,38	47,99	8,40
	0,23-0,63	42,46-54,24	5,11-11,81
MDA-MB-435	1,36	47,29	10,48
	0,98-1,88	41,53-59,60	7,66-14,32

A tabela está apresentando os valores de CL₅₀ e o intervalo de confiança de 95% de pelos menos dois experimentos independentes realizados em duplicata, para as células (HL-60), (HCT-8), (MDA-MB-435) e (SF295) obtidas pela regressão não-linear através do programa GraphPad Prism.

As propriedades citotóxicas do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* (óleo A) e de seu componente principal, ascaridol, foram confirmadas *in vivo* usando o tumor Sarcoma 180 como modelo. Uma redução significativa no peso do tumor foi observada em ambas as amostras e doses com relação ao grupo de controle (DMSO 10%) (Figura 2). Porém, o efeito do óleo essencial e do ascaridol não mostrou nenhuma diferença significativa entre as duas doses usadas *($p > 0,05$).

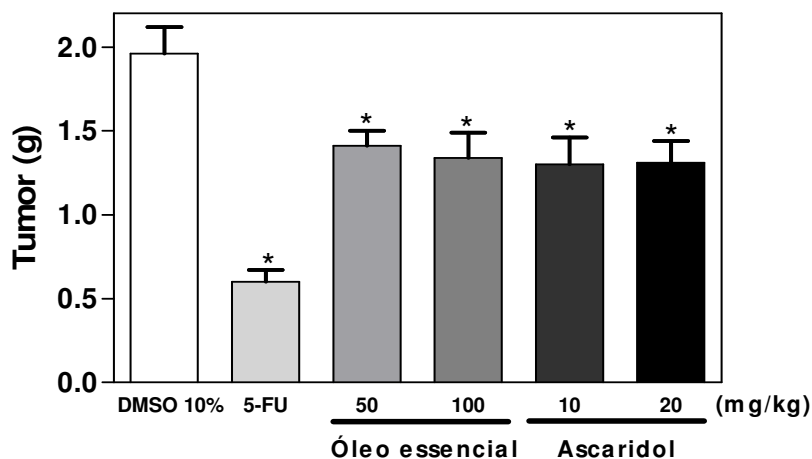


Figura 105 – Efeito do óleo essencial de *C. regelianus* (óleo A) e do ascaridol sobre o peso do tumor Sarcoma 180 transplantados em camundongos. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). Como controle positivo foi usado 5-FU (25 mg/Kg/dia). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de oito animais. * ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

A Tabela 52 (pág. 154) mostra o efeito do óleo essencial (óleo A) e do ascaridol em camundongos transplantados como o tumor Sarcoma 180. No oitavo dia, o peso médio do tumor era de $1,96 \pm 0,16$ g em camundongos controle e $1,41 \pm 0,09$ e $1,34 \pm 0,15$ g nos camundongos tratados com o óleo essencial nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Na presença do ascaridol, os pesos eram $1,30 \pm 0,16$ e $1,31 \pm 0,13$ g nas doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente. As relações da inibição do crescimento do tumor foram de 28,07–31,79 e 33,92–33,26% para o óleo essencial e o ascaridol, respectivamente. As inibições foram significantes quando comparadas ao grupo de controle (DMSO 10%), porém quando comparadas com a inibição apresentada pelo controle positivo usado, o 5-FU (69,48%),

com a dose de 25 mg/Kg dentro do mesmo período, não podem ser consideradas promissoras.

O tratamento com o óleo essencial de *C. regelianus* não alterou significativamente o peso dos rins e fígado, porém aumentou o peso dos baços, indicando um efeito imunomodulatório (Tabela 51). Na análise histopatológica, foram encontradas alterações morfológicas nos rins e fígado, porém, de maneira reversível.

Tabela 51 - Efeito do óleo essencial das folhas de *C. regelianus* e seu componente majoritário, ascaridol, em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180

Droga	Dose (mg/Kg)	Fígado (g/100g peso corp.)	Baço (g/100g peso corp.)	Rins (g/100g peso corp.)	Tumor (g)	Inibição (%)
DMSO 10%	-	4,71 ± 0,17	0,58 ± 0,04	1,03 ± 0,03	1,96 ± 0,16	-
5-FU	25	4,61 ± 0,15	0,29 ± 0,03*	1,18 ± 0,06	0,60 ± 0,07*	69,48*
Óleo essen.	50	5,02 ± 0,13	0,80 ± 0,02*	1,09 ± 0,04	1,41 ± 0,09*	28,07*
Óleo essen.	100	4,48 ± 0,17	0,78 ± 0,04*	1,04 ± 0,04	1,34 ± 0,15*	31,79*
Ascaridol	10	4,98 ± 0,46	0,71 ± 0,06*	1,08 ± 0,04	1,30 ± 0,16*	33,92*
Ascaridol	20	5,06 ± 0,25	0,86 ± 0,07*	1,21 ± 0,06	1,31 ± 0,13*	33,26*

Os dados estão apresentando a média ± E.P.M. de 8 animais. * (p<0,05) quando comparado com o grupo DMSO 10% por (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2.5 - Investigação bioguiada preliminar dos extratos e frações

Conhecendo o potencial anticancer apresentado pelo extrato hidroalcolico das folhas de *C. regelianus*, frente ao carcinosarcoma 256 Walker em camundongos transplantados (Moraes *et al.*, 1997), os extratos obtidos foram submetidos a testes preliminares para avaliação da atividade citotóxica no Departamento de Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação da Dra. Letícia Veras Costa-Lotuf, frente a linhagens de células tumorais humanas (item 5.2.2, pág. 150). De acordo com a classificação: AS (amostras sem atividade, inibição do crescimento celular < 1%), PA (amostras com pouca atividade, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), MO (amostra com atividade moderada, inibição de crescimento variando de 50 a 75%) e MA (muita atividade, inibição variando de 75 a 100%), somente os extratos hexânicos das folhas, talos e raízes de *C. regelianus* (Tabela 52, pág. 156), foram considerados com muita atividade. Isto nos motivou a investigar estes extratos visando o isolamento dos

metabólitos secundários responsáveis por tal atividade. Até o presente momento, somente os extratos hexânico das folhas e talos foram submetidos a estudos fitoquímicos. As frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanólica resultantes do fracionamento cromatográfico em coluna filtrante de ambos os extratos foram também avaliadas frente às linhagens de células. Resultados promissores foram obtidos com as frações oriundas da eluição com AcOEt de ambos extratos. A fração AcOEt das folhas (CRFH-A), considerada muito ativa, inibindo mais de 70% da proliferação das células (Tabela 53, pág. 156), enquanto a fração AcEOt dos talos (CRTH-A), mostrou atividade variando de moderada a muito ativa, inibindo mais de 60% do crescimento celular (Tabela 54, pág. 156).

A investigação fitoquímica da fração AcOEt do extrato hexânico das folhas (CRFH-A) conduziu ao isolamento de um material cristalino, codificado por **CRFH-1**, que também foi submetido avaliação da atividade citotóxica, porém apresentou-se como uma substância sem atividade (SA).

Para a fração AcOEt obtida do extrato hexânico dos talos (CRTH-A) diferentemente do procedimento realizado com a fração CRFH-A, as subfrações resultantes do fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (item 4.4.5.1, pág. 136) também tiveram seu potencial citotóxico avaliado, conforme descrito na Tabela 55 (pág. 157). Somente as subfrações CRTH-A2, CRTH-A3 e CRTH-A4, apresentaram resultados promissores, sendo estas selecionadas para investigação fitoquímica. O fracionamento cromatográfico da fração CRTH-A2 resultou no isolamento dos constituintes codificados por **CRTH-3** e **CRTH-4**, estas substâncias foram submetidas à avaliação do potencial antitumoral, porém não exibiram atividade antitumoral.

Como pode ser concluído não conseguimos isolar o(s) princípio(s) ativo(s), responsáveis pela atividade. Como os extratos ativos, foram os hexânico, acreditamos que o ascaridol possa ser um dos responsáveis pela atividade exibida por aqueles extratos.

Tabela 52 - Atividade citotóxica dos extratos de *C. regelianus*

Extratos	Linhagens celulares		
	HCT8 (%)	MDA-MB-435 (%)	SF295 (%)
CRTH *	66,85 (MO)	76,60 (MA)	81,43 (MA)
CRTE	68,36 (MO)	33,61 (PA)	48,19 (PA)
CRFH *	96,00 (MA)	91,01 (MA)	95,08 (MA)
CRFE	38,03 (PA)	41,49 (PA)	46,63 (PA)
CRRH *	95,40 (MA)	91,70 (MA)	97,35 (MA)
CRRE	63,96 (MO)	29,70 (PA)	43,98 (PA)

*Extratos que apresentaram resultados promissores

Tabela 53 - Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *C. regelianus*

Frações	Linhagens celulares		
	HCT8 (%)	MDA-MB435 (%)	SF295 (%)
CRFH-H	4,98 (PA)	26,92 (PA)	(SA)
CRFH-D	29,00 (PA)	26,14 (PA)	8,05 (PA)
CRFH-A*	74,90 (MA)	85,93 (MA)	74,39 (MA)
CRFH-M	20,42 (PA)	(SA)	(SA)

*Fração que apresentou resultados promissores

Tabela 54 - Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus*

Frações	Linhagens celulares			
	HCT8 (%)	HL60	MDA-MB-435 (%)	SF295 (%)
CRFH-H/D	(SA)	(AS)	(SA)	(SA)
CRFH-D	35,09 (PA)	35,06 (PA)	39,43 (PA)	(SA)
CRFH-A*	68,82 (MO)	78,09 (MA)	65,68(MO)	85,87 (MA)
CRFH-A/M	(SA)	(AS)	(SA)	(SA)

*Fração que apresentou resultados promissores

Tabela 55 - Atividade citotóxica das frações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração CRTH-A oriunda da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos de *C. regelianus*

Subfrações	Linhagens celulares		
	HCT8 (%)	MDA-MB-435 (%)	SF295 (%)
CRFH-A1	66,64(MO)	39,94 (PA)	42,16 (PA)
CRFH-A2*	92,54 (MA)	49,31 (PA)	80,76 (MA)
CRFH-A3*	103,6 (MA)	76,74(MA)	97,35 (MA)
CRFH-A4*	94,54 (MA)	39,39 (PA)	57,96 (MO)
CRFH-A5	74,25 (MO)	(SA)	39,39 (PA)
CRFH-A6	41,27 (PA)	(SA)	(SA)
CRFH-A7	36,88 (PA)	(SA)	37,53 (PA)
CRFH-A8	(SA)	(SA)	39,73 (PA)
DOX**	102,8 (MA)	104,68 (MA)	100,14 (MA)

*Frações que apresentaram resultados promissores
 ** Controle positivo

Capítulo 6

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

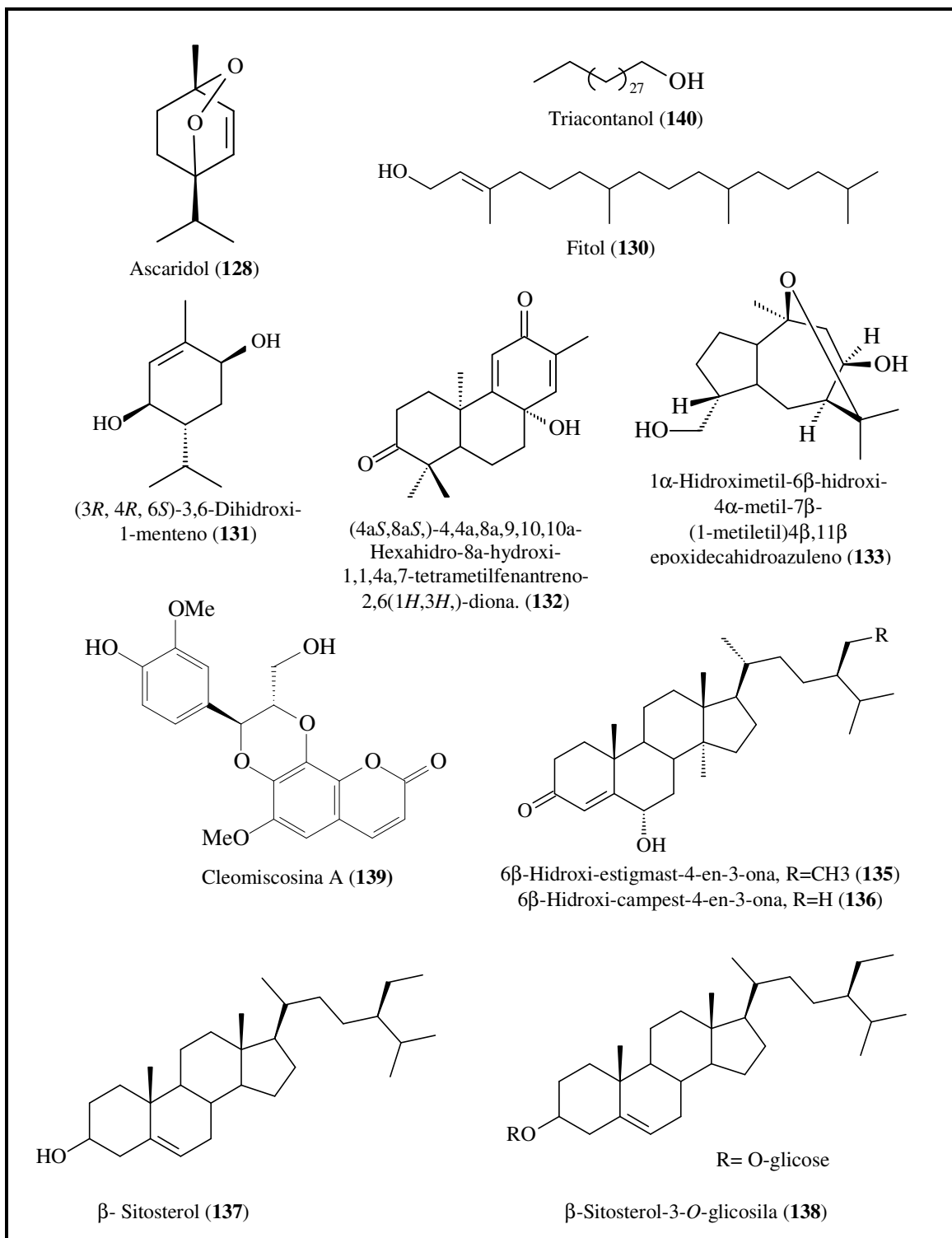
O estudo dos óleos essenciais das folhas de *C. regelianus*, coletado em duas localidades (óleo A, Viçosa-CE e óleo B, Garapa-CE), resultou na identificação de 20 constituintes, correspondendo a mais de 98% da composição química de cada óleo. Os óleos, ambos constituídos exclusivamente por monoterpenos, mostraram-se semelhantes quanto à composição química, diferindo, no entanto, quanto ao teor dos constituintes químicos. *p*-Cimeno (22,3%), ascaridol (17,0%), cânfora (13,0%) e limoneno (7,6%) foram os principais constituintes presentes no óleo A, enquanto, ascaridol (33,9%), *p*-cimeno (21,6%), α -terpineno (9,6%) e isoascaridol (7,5%) foram os compostos majoritários no óleo B.

Os óleos essenciais, em especial o óleo B, cujo componente majoritário foi o ascaridol, exibiram elevada atividade frente às larvas do *A. aegypti* e *Artemia* sp. e moderada atividade nematostática contra o fitonematoide *M. incognita*. Os resultados obtidos foram bastante promissores e apontam o óleo essencial de *C. regelianus* como um inseticida natural, eficaz no controle do *A. aegypti*. Com estes resultados, pode-se presumir que o ascaridol tenha sido o principal responsável pela atividade expressada pelos óleos, uma vez que a atividade foi potencializada quando o referido composto foi testado individualmente. Tanto os óleos, como o ascaridol, constituinte isolado do óleo B, apresentaram potente atividade citotóxica *in vitro*, quando comparados a óleos essenciais com alto potencial citotóxico. Esta propriedade foi confirmada *in vivo*, usando como modelo o tumor Sarcoma 180. Os resultados obtidos corroboram o uso etnofarmacológico de *C. regelianus*, no tratamento de tumores malignos.

A prospecção química dos extratos etanólico e hexânico das folhas e talos de *C. regelianus* resultou no isolamento e caracterização de 10 substâncias, pertencentes a classes de metabólitos secundários comum ao gênero. Os constituintes isolados foram um álcool graxo de cadeia carbônica normal, triacontanol; um diterpeno, fitol; um nor-diterpeno, (4a*S*,8a*S*)-4,4a,8a,9,10,10a-hexahidro-8a-hidroxi-1,1,4a,7-tetrametilfenantreno-2,6(1*H*,3*H*)-diona; um sesquiterpeno, 1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno; um monoterpeno, (3*R*, 4*R*, 6*S*)-3,6-dihidroxi-1-menteno; uma cumarina, a cleomiscosina A e os esteróides 6 β -hidroxi-campest-4-en-3-ona; 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona; β -sitosterol e sua respectiva forma glicosilada (Quadro 8, pág. 160).

Entre os compostos isolados os terpenóides 4a*S*,8a*S*)-4,4a,8a,9,10,10a-hexahidro-8a-hidroxi-1,1,4a,7-tetrametilfenantreno-2,6(1*H*,3*H*,-)diona e 1α-hidroximetil-6β-hidroxi-4α-metil-7β-(1-metiletil)-4β,11β-epoxi-decahidroazuleno, incluindo o derivado acetato de 1α-hidroximetil-6β-hidroxi-4α-metil-7β-(1-metiletil)-4β,11β-epoxi-decahidroazuleno, estão sendo relatados pela primeira vez na literatura. Os compostos (3*R*, 4*R*, 6*S*)-3,6-dihidroxi-1-menteno; a cleomiscosina A e os esteróides 6β-hidroxi-campest-4-en-3-ona e 6β-hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, apesar de conhecidos, são inéditos no gênero *Croton*.

Contrariando nossas expectativas, nenhum destes compostos mostrou atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais de cólon (HCT8), mama (MDA-MB-435), leucemia (HL60) e cérebro (SF295).



Quadro 8 – Estruturas dos metabólitos secundários isolados de *C. regelianus*

Capítulo 7

CONSTANTES FÍSICAS E DATOS ESPECTROSCÓPICOS

7 - CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

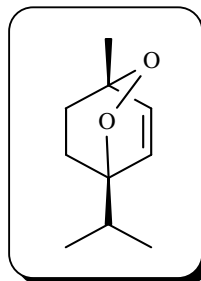
7.1 – Terpenos

7.1.1- CRB-1

F.M.: C₁₀H₁₆O₂

P.M: 168 Daltons

Aspecto: óleo amarelo claro



Ascaridol (128)

Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm⁻¹): 3031; 2967; 2933; 2884; 1246; 1116; 1017.

Espectrometria de massa (70 eV) *m/z*: 168; 136; 121; 107; 93; 79; 69; 43; 41.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): Tabela 11, pág. 36.

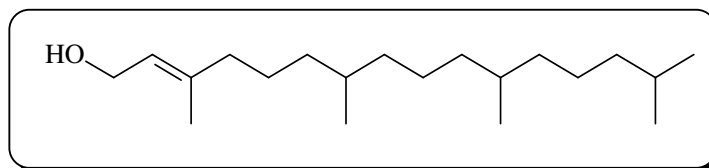
Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Tabela 11, pág. 36.

7.1.2- CRFH-2

F.M.: C₂₀H₄₀O

P.M: 296 Daltons

Aspecto: resina incolor



Fitol (130)

Espectrometria de massa (70 eV) *m/z*: 294; 293; 123; 111; 95; 71; 57; 43.

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Tabela 12, pág. 41.

7.1.3 – CRFH-4

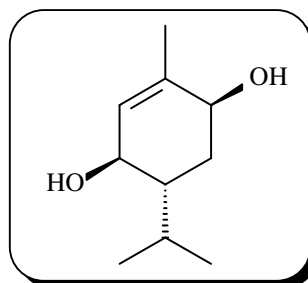
F.M.: C₁₀H₁₈O₂

P.M: 170 Daltons

Aspecto: sólido cristalino

Ponto de fusão: 166,7 – 168,2 °C

Ponto de fusão Lit: 166 – 168 °C

(3R,4R,6S)- 3,6-Dihidroxi-1-menteno (**131**)

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3417; 2935; 2866; 1643; 1466; 1381; 1240; 1192; 956.

Espectrometria de massa (70 eV) *m/z*: 152; 134; 119; 110; 95; 91; 82; 58; 44; 39.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, MeOD): Tabela 14, pág. 48.

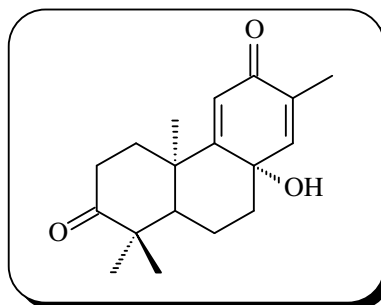
Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD): Tabela 14, pág. 48.

7.1.4 – CRTH-4

F.M.: C₁₈H₁₄O₃

P.M: 288,1725 Daltons

Aspecto: resina amarela clara

(4aS,8aS)-4,4a,8a,9,10,10a-hexahidro-8a-hidroxi-1,1,4a,7-tetrametilfenantreno-2,6(1H,3H,-)diona (**132**)

Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm⁻¹): 3414; 2933; 2868; 1727; 1727; 1711; 1461; 1461; 1373.

Espectrometria de massa (IES) *m/z*: 289,1798 Daltons

EM/EM-IES *m/z*: 271,0987; 261,1982; 255,2206; 203,1029.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): Tabela 16, pág. 60

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Tabela 16, pág. 60

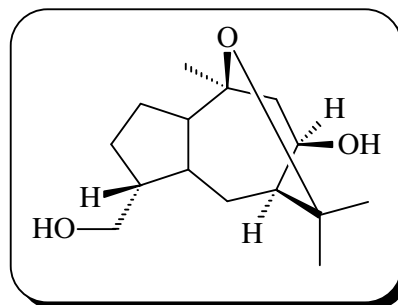
7.1.5 – CRTE-2

F.M.: C₁₅H₂₆O₃

P.M: 254,1876 Daltons

Aspecto: sólido cristalino

Ponto de fusão: 90,0 – 91,4 °C



1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno (**133**)

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm⁻¹): 3344; 2918; 2860; 1451; 1374; 1236; 1158; 1122; 1050.

Espectrometria de massa (IES) *m/z*: 277,1774 Daltons [M+Na]⁺

EM/EM-IES *m/z*: 277,1774; 219,1493; 261,179,2183; 161,1849.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, MeOD): Tabela 18, pág. 71

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD): Tabela 18, pág. 71

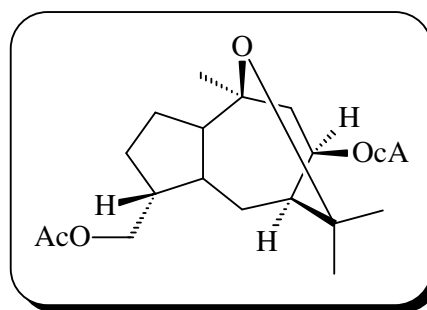
7.1.6 – CRTE-2Ac

F.M.: C₁₅H₂₆O₃

P.M: Daltons

Aspecto: sólido cristalino

Ponto de fusão: 79,2 – 80,5 °C



Acetato de 1 α -hidroximetil-6 β -hidroxi-4 α -metil-7 β -(1-metiletil)-4 β ,11 β -epoxi-decahidroazuleno (**134**)

Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm⁻¹): 2939; 2871; 1738; 1454; 1367; 1243; 1125; 1091; 1028.

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): Tabela 19, pág. 78

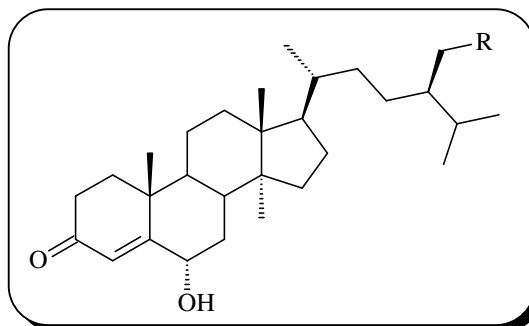
Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Tabela 19, pág. 78

7.2 – Esteróides

7.2.1 – CRTH-3

F.M.: C₂₉H₄₈O₂ (**135**) e C₂₈H₄₆O₂ (**136**)P.M: 428 (**135**) e 414 (**136**) Daltons

Aspecto: resina incolor



6β-hidroxi-estigmast-4-en-3-ona, R = CH₃ (**135**)
 6β-hidroxi-campest-4-en-3-ona, R = H (**136**)

Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm⁻¹): 3446; 2933; 2860; 1714; 1464; 1373; 1178.Espectrometria de massa (70 eV) *m/z*: 428; 414; 399; 413; 287; 269; 245; 227; 152.Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): Tabela 21, pág. 86Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Tabela 21, pág. 86

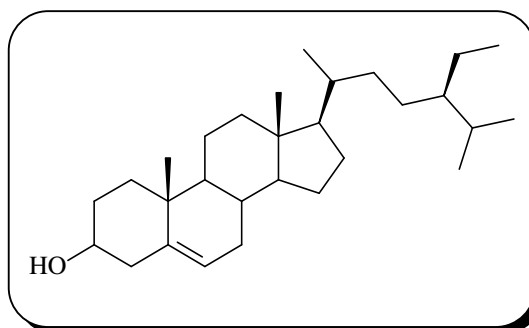
7.2.2 – CRFH-3

F.M.: C₂₉H₅₀O

P.M: 414 Daltons

Aspecto: cristais aciculares

Ponto de fusão: 121,8 – 122,6 °C

β- sitosterol (**137**)Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm⁻¹): 3427; 2935; 2868; 1645; 1466; 1379; 1053.Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): Tabela 22, pág. 93

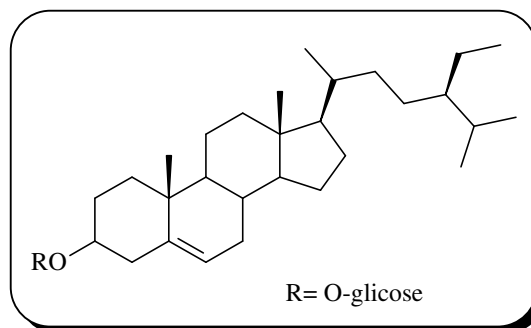
7.2.2 – CRFE-2

F.M.: $C_{35}H_{60}O_6$

P.M: 414 Daltons

Aspecto: sólido branco amorfo

Ponto de fusão: 293,0 – 294,1 °C



β -Sitosterol-3-O-glicosila (138)

Espectroscopia na região do I.V. (NaCl, cm^{-1}): 3410; 2960; 2868; 1637; 1074; 1020

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, piridina- d_5): Tabela 23, pág. 97

6.3 – Cumarina

6.3.1 – CRTE-1

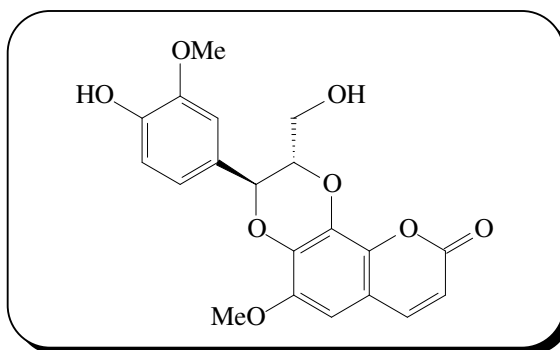
F.M.: $C_{20}H_{18}O_8$

P.M: 386 Daltons

Aspecto: sólido amorfo

Ponto de fusão: 246,0-247,4 °C

Ponto de fusão (Lit.): 247,0 °C



Cleomiscosina A (139)

Espectroscopia na região do I.V. (KBr, cm^{-1}): 3453; 3079; 2940; 1703; 1613; 1578; 15,23; 1446; 1425; 1280; 1236; 1162; 1130; 1059; 993; 946; 834.

Espectrometria de massa (70 eV) m/z : 386; 368; 353; 328; 249; 219; 180; 162; 137; 124.

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, piridina- d_5): Tabela 26, pág. 106

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, piridina- d_5): Tabela 26, pág. 106

7.4 - Álcool graxo

7.4.1 – CRFH-1

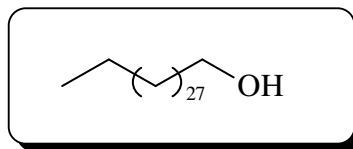
F.M.: C₃₀H₆₂O

P.M: 438 Daltons

Aspecto: sólido branco amorfo

Ponto de fusão: 81,2 – 82,4°C

Ponto de fusão Lit.: 81 – 82 °C



Triacontanol (140)

Espectrometria de massa (70 eV) m/z : 420; 378; 362; 139; 125; 111; 97; 71; 57; 43; 41.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 10, p. 1215-1219, 2002

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gás chromatografia/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Comporation, 2001.

AGNER, A.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; COLUS, I. S. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*, **Planta. Med.**, v. 67, n. 9, p. 815-819, 2001.

AGNER, ANIELE R.; MACIEL, MARIA A. M.; PINTO, ANGELO C.; PAMPLONA, SONIA G. S. R.; COLUS, I. M. S. Investigation of genotoxic activity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Terat. Carcin, Mutag.**, v. 19, n. 6, p. 377-384, 1999.

ALBUQUERQUE, M. M. F. DE; LYRA, F. D. DE A.; MELLO, J. F. DE; LIMA, O. G. DE; MONACHE, F. D.; DIU, M. B. DE S.; MOREIRA, L. C. Antimicrobial substances of higher plants. Communication XLIV. Isolation of a diterpenic acid from *Croton argyrophylloides* Muel. Arg. (Euphorbiaceae). **Rev. Inst. Antibiot.**, v. 14, n. 1-2, p. 83-9, 1974.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SILVEIRA, E. R.; UCHÔA, D. E. DE A.; LEMOS, T. L. G.; SOUZA, E. B.; SANTIAGO, G. M. P.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal of the essencial oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6708-6711, 2004.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásticos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicology**, v. 203, n.1-3, 123-13, 2004

ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, H. E.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T.; DA SILVA, V. O. chemistry of Brazilian Euphorbiaceae. Part 3. Diasin, a diterpene from *Croton diasi*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 10, p. 1773-6, 1978.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES M. L.; BOLOGNE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. T. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microb. Immunol.**, v. 20, p. 101-105, 2005

AMARAL, A. C. F.; BARNES, R. A. Clerodane diterpenoids from *Croton hemiargyreus*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 12, n. 1, p. 41-46, 1998.

AMARAL, A. C. F.; BARNES, RODERICK A. Alkaloids of *Croton celtidifolius*. **Planta Med.**, v. 63, n. 5, 485, 1997.

AMARAL, ANA CLAUDIA F.; BARNES, RODERICK A. A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1445-1447, 1998.

ARAÚJO-JUNIOR, V. T. DE; NAVARRO, P. A.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. DE F.; GRAY, A. I.; BARBOSA-FILHO, J. M. Diterpenes from *Croton polyandrus*, **Ciencia**, v. 10, n. 3, p. 286-290, 2002.

ARAÚJO-JUNIOR, V. T. DE; SILVA, M. S. DA; DA-CUNHA, E. V. L. ; AGRA, M. DE F.; SILVA-FILHO, R. N. DA; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and Diterpenes From *Croton moritibensis*. **Pharm. Biol.**, v. 42, n.1, p. 62-67, 2004.

ARAÚJO-JUNIOR, V. T.; DA SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. DE F.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 3B, p. 553-557, 2005.

ATTA-UR-RAHMAN; AHMAD, V.-U. ¹³C NMR of Natural Products – Diterpenes vol. 2. New York: Plenum Press, 1992.

BACCELLI, C.; BLOCK, S.; VAN HOLE, B.; SCHANCK, A.; CHAPON, D.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; MOREL, N.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCl-induced contraction. **Planta Med.**, v. 71, p. 1036-1039, 2005.

BARBOSA, P. R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F. Benzoyl-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae), **ARKIVOC**, v.6, p. 95-102, 2004.

BARBOSA, P. R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; SILVA G., MARIA L.; ROQUE, N. F. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 31, n. 3, p. 307-308, 2003.

BARNES, R. A.; SOEIRO, O. M. The alkaloids of *Croton salutaris*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 3, p. 543-544, 1981.

BEZERRA, M. Z. B.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ROUQUAYROL, M. Z. A new species of the genus *Croton* and the unexpected pharmacological activity of some of its chemical constituents. **Quim. Nova**, v. 9, n. 4, p. 271-3, 1986.

BOAS, L. C. V.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA V.; SILVA NETO, S. P. DA; ROCHA, H. S. Reações de clones de bananeiras (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Rev. Bras. Frutic**, v.24, n.3 p. 690-693, 2002.

BRITO, A. R. M. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; HAUN, M.; N., D. S. Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 64, n. 2, p. 126-129, 1998.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 116-120, 2002.

CAMURCA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S.; Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and sidoudes essential oils. **Vet. Parasitol.**, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CARVALHO, J. C. T.; SILVA, M. F. C.; MACIEL, M. A.M.; PINTO, A. C; NUNES, D. S.; LIMA, R.M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Med.**, v. 62, n. 5, p. 402-404, 1996.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA E. W. P.; Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

- CHACKO, S.; SETHURAMAN, M. G.; GEORGE, V.; PUSHANGADAN, P. Phytochemical constituents of *Trichopus zeylanicus* ssp. Travancoricus. **J. Med. Arom. Plant Sci.**, v. 24, n. 3, p. 703-706, 2002.
- CHAG, K. S.; TAK, J-H.; KIM, I.; LEE, W-J.; AHN, Y-J . Repellency of Cinnamomum bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. **Pest Manag. Sci.**, v. 62 n. 11, p. 1032-1038, 2006.
- CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **J. Ethnopharmacol.**, V. 72, p. 185-189, 2000.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHAES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother. Res.**, v. 11, n. 4, p. 299-304, 1997.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea -pig. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 3, p.189-194, 1998.
- COSENTINO, R. M.; NORTE, M. C. B.; LAZARINI, C. A. Estragole-induced behavioural changes in rats. **Phytother. Res.**, v. 18, n. 11, p. 921-924,2004.
- COSTA, A. M. LUNA; SILVA, J. C. R.; CAMPOS, A. R.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Antiestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. **Phytother. Res.**, v. 13, n. 8, p. 689-691, 1999.
- COSTA, M. P.; MAGALHÃES, N. S. S.; GOMES, F. E. S.; MACIEL, M. A. M.; DONNICI, C. L. A review of the biologicaz activities of *trans*-desidrocrotonina, a natural product obtained from de *Croton cajucara*. **Rev. Bras. Farmag.**, V. 17, n 2, p. 275-286, 2007.
- CRAVEIRO, A. A.; FRENANDES, A.G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. DE A.; ALENCAR, J. W. DE; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essências de Plantas do Nordeste** EUFC, Fortaleza, 1981.
- CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 852-854, 1981

CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRO, E. R. Two cleistanthane-type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-4, 1982.

DALBO, S.; JUERGENSEN, S.; HOST, H.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharm. Biochem. Behavior**, v. 85, n. 2, p. 317-323, 2006.

DALBO, S.; JUERGENSEN, S.; HORST, H.; RUZZA, A. A.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 6, p. 765-771, 2005.

D'ALBUQUERQUE, I. L.; MONACHE, F. D.; FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. *p*-(trans-1,2-Epoxy-1-propyl)phenyl isovalerate (sellovicine B), an antibacterial substance from *Croton sellowii* Gazzetta. **Chim. Italiana**, v. 98, n. 10, p. 1189-96, 1968.

EFFERTH, T.; OLBRICH, A.; SAUERBREY, A.; ROSS, D. D.; GEBHART, E.; NEUGEBAUER, M. Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multidrug-resistant tumor cells. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 6C, p. 4221-4224, 2002.

EISENREICH, W.; HOEFNER, G.; BRACHER, F. Alkaloids from *Croton flavens* L. and their affinities to GABA-receptors. **Nat. Prod. Res.**, v. 17, p. 437-440, 2003.

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA A. M.; SAMPAIO S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Inter. J. phytother. phytopharmacol.**, v. 12, n. 8, p. 570-6, 2005.

FARIAS, R. A. F.; RAO, V. S. N.; VIANA, G. S. B.; SILVEIRA, E. R.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 63, n. 6, p. 558-560, 1997.

FREIRE, A. C. G.; MELO, P. DA SILVA; AOYAMA, H.; HAUN, M.; DURAN, N.; FERREIRA, C. V. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. **Planta Med.**, v. 69, n. 1, p. 67-69, 2003.

- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A. DE; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA M. G. DE V. Atividade lanvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 35, n. 5, p. 843-847, 2005.
- GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 53, n. 6, p. 1430-1435, 1990.
- GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J. E.; PAMPLONA, S. S. R.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Anti-tumour activity of 2 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotinin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 65, n. 8, p. 687-689, 1999.
- GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL FILHO, V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n 2, p. 409-412, 2005.
- GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, D. T.; MATTOS, P. O.; RAO, V. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytother. Res.**, v. 15, n. 4, p. 319-322, 2001.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; NUNES, D. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa, **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 523-529, 2002.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. SOUZA. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, n. 3, p. 341-346, 1999.
- LIMA, C. A. H.; GRACIOSO, J. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. DE S.; ALMEIDA, A. B. A. DE; BATISTA, L. M.; MAGRI, L.; BENSUASKI DE PAULA, A. C.; SOARES, F. R.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. S. Natural trans-crotonin: The antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 4, p. 452-456, 2002.

HUI, W-H.; LI, M-M.; Ng, K-K. Euphorbiaceae of Hong Kong. X. Terpenoids and steroids from *Macaranga tanarius*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 3, p. 816-817, 1975.

JOLY, A. B. **BOTÂNICA : Introdução a Taxonomia Vegetal**, 12° ed. São Paulo, Editora Nacional, 1998.

KIUCHI, F.; ITANO, Y.; UCHIYAMA, N.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 509-512, 2002.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990

LAZARINI, C. A.; UEMA, A. H.; BRANDAO, G. M. S.; GUIMARAES, A. P. C.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, v. 7, n. 6, p. 477-481, 2000

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHAES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* Decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Med.**, v. 66, n. 2, p. 138-143, 2000.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHAES, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats. Role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 65, n. 6, p. 553-557, 1999.

LEMONS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; BARBOSA, R. C. S. B.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 26, 1992.

LI, X-Q, GAO, K.; JIA, Z-J. Eremophiloides and other constituents from the roots of *Ligularia sagitta*. **Planta Med.**, V. 69, p. 356-360, 2003.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. **Rev. Eletrôn. Farm.**, v. 3, n. 2, p. 10-12, 2006.

LIMA, D. P.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, O. G. DE; LACERDA, A. L.; MACIEL, G. M.; MARTINS, D. G. Antimicrobial substances from higher plants. XLIII.

Antimicrobial action of an active principle isolated from the callus of *Croton jacobinensis* (Euphorbiaceae). **Rev. Inst. Antibiot.**, v. 13, n. 1-2, p. 31-35, 1973.

LOPES, M. I. L.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidante activities of *Cróton lechleri* sap in biological systems. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 437-445, 2004.

LOPES, M. I. L. E.; SAFFI J.; ECHEVERRIGARAY S.; PEGAS, H. J. A. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, n. 2-3, p. 437-445, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; COLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.

MACIEL, M. A. M.; MARTINS, J. R.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia cells. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 2, p. 391-396, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S.; DA SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 823-828, 1998.

MAGALHAES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R.L A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MAGALHAES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: A myogenic activity. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v. 18, n. 5, p. 539-546, 2004.

MAGALHAES, P. J. C.; LAHLOU, S.; VASCONCELOS DOS SANTOS, M. A.; PRADINES, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Med.**, v. 69, n. 9, p. 874-877, 2003.

MATOS, F. J. DE A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste: Propriedades Atribuídas e Confirmadas**. Fortaleza: EUFC, 1999.

MELO, P. S.; DURAN, N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HAUN, M. Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. **J. Ethnopharmacol.**, v. 87, n. 2-3, p. 169-174, 2003.

MELO, P. S.; JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; HAUN, M.. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 487, n. 1-3, p. 47-54, 2004

MONTE, F. J. Q.; ANDRADE, C. H. S.; CRAVEIRO, A. A. New tetracyclic diterpenes from *Croton argyrophyloides*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 1, p. 55-58, 1984.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; BRAZ-FILHO, R. New diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209-3212, 1988

MORAES, M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Screenig for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 3, p. 235-239, 1997.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; ARAUJO DA SILVA, A. R.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L.; Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L.L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.**, v. 22, n. 1, p. 161-164, 2006.

MUKHERJEE, R.; AXT, E. M. Cyclitols from *Croton celtidifolius*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2682-2684, 1984.

NARDI, G. M.; DALBO, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 1, p. 73-8, 2006.

NARDI, G. M.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M.; DELLE, F. M.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; VALLE, R. M. R. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2-3, p. 115-122, 2007

NEERGHEEN, V. S.; BAHORUN, T.; JEN, L-S.; ARUOMA, O. I. Bioefficacy of mauritian endemmic medicinal plants: assessment of their phenolic contents and antioxidante potential. **Pham. Biology**, v. 45, n. 1, p. 9-17, 2007.

NORTE, M. C. B.; COSENTINO, R. M.; LAZARINI, C. A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 294-298, 2005

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 11, p. 1471-1474, 2001.

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

PALMEIRA-JUNIOR, S. F. Contribuição ao conhecimento quimiotaxonômico da família Euphorbiaceae: estudo químico de duas espécies do gênero *croton* (*C. sellowii* Baill. E *C. brasiliensis* Muell. Arg). **Tese de Doutorado (Química e Biotecnologia)**, Departamento de Química, Centros de Ciências, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, 2005.

PALMEIRA-JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae), **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 3, p. 397-402, 2006.

PAULA, A. C. B.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; BRITO, A. R. M. SOUZA. The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than in malnourished rats. **Brit. J. Nutrit.**, v. 92, n. 2, p. 310-315, 2006.

PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v. 49, n. (1), p. 171-174, 1998.

PERES, M. T.; DELLE MONACHE F; CRUZ A B; PIZZOLATTI M G; YUNES R A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 223-226, 1997.

POERSCH, A.; VIEIRA, F. S.; MACIEL, M. A. M.; PEREIRA, J. K. C.; DANTAS, T. N. C. COLUS, I. M. S. Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. **Mut. Res., Genet.Toxicol. Environ.Mutag.**, v. 629, n. 1, p. 14-23, 2007.

PRATA, E. M. R.; PAULO, M. Q.; BRITO, A. R. M. S. Isolation of active substances from *Croton campestris* St. Hil. (Euphorbiaceae) leaves. **Rev. Bras. Farma.**, v. 74, n. 2, p. 36-41, 1993.

RADCLIFFE-SMITH, A. A new *Croton* variety of pharmacognostic significance from Eastern Brazil. **KEW BULL**, v. 49, n. 1, p. 49-50, 1993.

RAY, A. B.; CHATTOPADHYAY, S. K.; KUMAR, S.; KONNO, C.; KISO, Y.; HIKINO, H. Structures of cleomiscosins, coumarino-lignoids of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron**, v. 41, n. 1, p. 209-214, 1985

RODRIGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. M. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 23, n. 9, p. 455-461, 2004.

ROSA, M. DO S. S.; MENDONCA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. DE A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, ANGELA H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*, **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

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

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sci.**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.

SANTOS, H. S.; SANTIAGO, G. M. P.; OLIVEIRA, J. P. P.; ARRIAGA, A. M. C.; MARQUES, D. D.; LEMOS, T. L. G. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton zehntneri*. **Nat. Prod. Comm.**, v. 2, n. 12, p. 1233-1236, 2007.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R. M. O-Glycosyl flavonoids from *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SIGURDSSON S, OGMUNDSDOTTIR HM, GUDBJARNASON S. The cytotoxic effect of two chemotypes of essential oils from the fruits of *Angelica archangelica* L. **Anticancer Res.**, v. 25, n. 3B; p. 1877-80, 2005

SILVA, R. M.; OLIVEIRA, F. A.; CUNHA, K. M. A.; MAIA, J. L.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. **Vasc. Pharmacol.**, v. 43, n. 1, p.11-18, 2005.

SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; RAO, V. S. N. Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. **Planta Med.** v. 67, n. 8, p. 763-765, 2001.

SILVEIRA, E. R.; MCCHESENEY, J. D. 6,7-oxygenated neo-clerodane furan diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1457-1463, 1994.

SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005.

SILVERTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5°. ed. São Paulo: LTC, 1991.

SIMOES, J. C.; SILVA, A. J. R. DA; SERRUYA, H.; BENTES, M. H. DA S. Dehydrocrotonin, a norditerpenoid from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Cien. Cult.**, v. 31, n. 10, p. 1140-1141, 1979.

SIQUEIRA, R. J. B.; MAGALHAES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci.**, v. 78, n. 20, p. 2365-2372, 2006.

SOUZA, M. V. N.; Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, S. R.; VEIGA, F., Jr; CORTEZ, J, K. P. C.; LEAL, R. S.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M. Chemical composition of the fixed oil of *Croton cajucara* and its antifungal properties. **Rev. Bras. Farmagn.**, v. 16, n. sulp., p. 599-610, 2006.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LAVOIE, S.; LONGTIN, A.; LEGAULT, J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.). **Phytother Res.**, v. 26, n.6, p. 536-540, 2007

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leave essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 99-102, 2006.

TIEPPO, M.; PORAWSKI, M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, A. J.; COLLADO, P. S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; MARRONI, N. P. *Croton cajucara* BENTH. Leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 1, p. 161-165, 2006.

VIEIRA, G. JR; FERREIRA, P. M.; MATOS, L. G.; FERREIRA, E. C.; RODOVALHO, W.; FERRI, P. H.; FERREIRA H. D.; COSTA, E. A. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 8, p. 892-896, 2003.

VIETLA, S. R.; LUILMA, A. G.; LIMA-JUNIOR R. C. P.; DOMINGOS T. O. M.; CECHINEL-FILHO, V.R.; SANTOS, F. A. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, n. 2, p. 357-360, 2007.